



REC'D 06 OCT 2003  
WIPO PCT

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

### COPIE OFFICIELLE

BEST AVAILABLE COPY

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 10 juil. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

#### DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 260399

Réservé à l'INPI

<b>REMISSION DES PIÈCES</b> <b>DATE</b> <b>LIEU</b> <b>N° D'ENREGISTREMENT</b> <b>NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI</b> <b>DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE</b> <b>PAR L'INPI</b>		<b>1. NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> <b>À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b>  <b>BECKER ET ASSOCIES</b> <b>35 rue des Mathurins</b> <b>75008 PARIS</b>	
<b>8 JUIL 2002</b> <b>75 INPI PARIS</b> <b>0208571</b> <b>- 8 JUIL. 2002</b>			
<b>Vos références pour ce dossier</b> <i>( facultatif )</i> B0142FR			
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b> <input type="checkbox"/> <b>N° attribué par l'INPI à la télécopie</b>			
<b>2. NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N°	Date ..... / ..... / .....
		N°	Date ..... / ..... / .....
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/>	Date ..... / ..... / .....
		N°	Date ..... / ..... / .....
<b>3. TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)  <i>Nouveaux dérivés de 1,3-diphénylprop-2-én-1-one substitués, préparation et utilisations</i>			
<b>4. DÉCLARATION DE PRIORITÉ</b> <b>OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE</b> <b>LA DATE DE DÉPÔT D'UNE</b> <b>DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation Date ..... / ..... / ....., N°  Pays ou organisation Date ..... / ..... / ....., N°  Pays ou organisation Date ..... / ..... / ....., N°  <input type="checkbox"/> <b>S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »</b>	
<b>5. DEMANDEUR</b>		<input type="checkbox"/> <b>S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »</b>	
Nom ou dénomination sociale		GENFIT	
Prénoms			
Forme Juridique		Société Anonyme	
N° SIREN		; 4 . 2 . 4 . 3 . 4 . 1 . 9 . 0 . 7 ;	
Code APE-NAF		17 . 3 . 1 . Z .	
Adresse	Rue	Parc Eurasanté - Lille Métropole 885, avenue Eugène Avinée	
	Code postal et ville	59120	LOOS
Pays		France	
Nationalité		Française	
N° de téléphone <i>( facultatif )</i>			
N° de télécopie <i>( facultatif )</i>			
Adresse électronique <i>( facultatif )</i>			

**BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REPRISE DES PIÈCES		Réervé à l'INPI
DATE	8 JUIL 2002	
LIEU	75 INPI PARIS	
N° D'ENREGISTREMENT	0208571	
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		

DB 540 W /260899

<b>6 Vos références pour ce dossier :</b> ( facultatif )		B0142FR
<b>6.1 MANDATAIRE</b>		
Nom		TEZIER HERMAN
Prénom		Béatrice
Cabinet ou Société		BECKER ET ASSOCIES
N ° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		00-10000
Adresse	Rue	35, rue des Mathurins
	Code postal et ville	75008 PARIS
N° de téléphone ( facultatif )		01 53 43 85 00
N° de télécopie ( facultatif )		01 53 43 85 05
Adresse électronique ( facultatif )		btezier@becker.fr
<b>7 INVENTEUR (S)</b>		
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		
		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention ( joindre un avis de non-imposition ) <input type="checkbox"/> Requise antérieurement à ce dépôt ( joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence ) :
<b>Si vous avez utilisé l'imprimé « Suite », indiquez le nombre de pages jointes</b>		
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> ( Nom et qualité du signataire )		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>   Cote
TEZIER HERMAN Béatrice n- 00-10000		

NOUVEAUX DERIVES DE 1,3-DIPHENYLPROP-2-EN-1-ONE SUBSTITUES,  
PREPARATION ET UTILISATIONS

5 La présente invention concerne de nouveaux dérivés de 1,3-diphénylprop-2-én-1-one substitués, des compositions pharmaceutiques les comprenant, leurs applications en thérapeutique, notamment pour le traitement de l'ischémie cérébrale. Elle a également trait à un procédé de préparation de ces dérivés.

10 En France, la pathologie vasculaire cérébrale (150000 nouveaux cas par an) représente la troisième cause de mortalité et la première cause de handicap chez l'adulte. Les accidents ischémiques et hémorragiques concernent respectivement 80% et 20% de cette pathologie. Les accidents ischémiques cérébraux constituent un enjeu thérapeutique important pour diminuer la morbidité et la mortalité de cette affection. Des avancées ont été faites non seulement dans le traitement de la phase aiguë de l'ischémie mais également dans sa prévention. Il est aussi important de noter que l'identification et la prise en charge des facteurs de risque sont essentielles au traitement de cette pathologie.

20 Les traitements médicamenteux des accidents ischémiques cérébraux sont fondés sur différentes stratégies. Une première stratégie consiste à prévenir la survenue des accidents ischémiques cérébraux par la prévention des facteurs de risque (hypertension artérielle, hypercholestérolémie, diabète, fibrillation auriculaire, etc.) ou par la prévention de la thrombose, en particulier à l'aide d'anti-agrégants plaquettaires ou d'anticoagulants (Gorelick 2002) (Adams 2002).

25 Une deuxième stratégie consiste à traiter la phase aiguë de l'ischémie, afin d'en diminuer les conséquences à long terme (Lutsep and Clark 2001).

30 La physiopathologie de l'ischémie cérébrale peut être décrite de la façon suivante : la zone de pénombre, zone intermédiaire entre le cœur de l'ischémie où les neurones sont nécrosés et le tissu nerveux intact, est le siège d'une cascade physiopathologique qui aboutit en quelques jours à la mort neuronale, si la reperfusion n'est pas assurée ou si la neuroprotection n'est pas assez efficace. Le

premier événement, qui survient dans les premières heures, est une libération massive de glutamate qui aboutit à une dépolarisation neuronale ainsi qu'à un œdème cellulaire. L'entrée de calcium dans la cellule induit des dégâts mitochondriaux favorisant la libération de radicaux libres ainsi que l'induction 5 d'enzymes qui provoquent la dégradation membranaire des neurones. L'entrée de calcium et la production de radicaux libres activent à leur tour certains facteurs de transcription, comme NF- $\kappa$ B. Cette activation induit des processus inflammatoires comme l'induction de protéines d'adhésion au niveau endothérial, l'infiltration du 10 foyer ischémique par les polynucléaires neutrophiles, l'activation microgliale, l'induction d'enzymes comme l'oxyde nitrique (NO) synthase de type II ou la cyclooxygénase de type II. Ces processus inflammatoires conduisent à la libération de NO ou de prostanoïdes qui sont toxiques pour la cellule. L'ensemble 15 de ces processus aboutit à un phénomène d'apoptose provoquant des lésions irréversibles (Dirnagl, Iadecola et al. 1999).

15

Le concept de neuroprotection prophylactique s'appuie sur des bases expérimentales mettant en évidence une résistance vis-à-vis de l'ischémie dans des modèles animaux. En effet, différentes procédures appliquées préalablement 20 à la réalisation d'une ischémie cérébrale expérimentale permettent de rendre celle-ci moins sévère. Différents stimuli permettent d'induire une résistance à l'ischémie cérébrale : le préconditionnement (ischémie brève précédant une ischémie prolongée) ; un stress thermique ; l'administration d'une faible dose de lipopolysaccharide bactérien (Bordet, Deplanque et al. 2000).

Ces stimuli induisent des mécanismes de résistance qui activent des 25 signaux déclenchant les mécanismes de protection. Différents mécanismes de déclenchement ont été mis en évidence : cytokines, voies de l'inflammation, radicaux libres, NO, canaux potassique ATP dépendant, adénosine. Le délai observé entre le déclenchement des événements précoces et la résistance à l'ischémie provient de la nécessité d'une synthèse protéique. Différents types de 30 protéines ont été décrits comme induisant la résistance à l'ischémie : les protéines du choc thermique, les enzymes anti-oxydantes et les protéines anti-apoptotiques (Nandagopal, Dawson et al. 2001).

Il existe donc un réel besoin de composés capables de prévenir l'apparition des facteurs de risque de l'accident vasculaire cérébral tels que l'athérosclérose, le diabète, l'obésité, etc., capables d'exercer une activité prophylactique en terme de neuroprotection mais également d'assurer une neuroprotection active dans la phase aiguë des accidents ischémiques cérébraux.

Les fibrates sont largement utilisés dans le cadre du traitement des hypertriglycéridémies. Ils ont également des effets favorables au niveau de l'hypercholestérolémie. Les fibrates ont un spectre d'action pléiotropique. Ils activent une classe de récepteurs nucléaires (PPARs) impliqués dans la coordination de l'expression de protéines responsables du transport ou du métabolisme des lipides. Le caractère pléiotropique du spectre d'action des fibrates réside dans la diversité des gènes cibles des PPARs. En effet, les fibrates sont capables de normaliser la lipémie et donc de réduire le développement de l'athérosclérose, mais ils ont également des propriétés anti-inflammatoires sur la paroi vasculaire et sur la thrombose (Fruchart, Staels et al. 2001).

Les PPARs ( $\alpha, \beta, \gamma$ ) appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires activés par les hormones. Lorsqu'ils sont activés par une association avec leur ligand, ils s'hétérodimérisent avec le Retinoïd-X-Receptor (RXR) et se fixent alors sur des « Peroxisome Proliferator Response Elements » (PPREs) qui sont localisés dans la séquence des promoteurs des gènes cibles. La fixation de PPAR sur le PPRE induit ainsi l'expression du gène cible (Fruchart, Staels et al. 2001).

Les PPARs sont distribués dans une grande variété d'organes, mais avec une certaine tissu-spécificité pour chacun d'entre eux à l'exception de PPAR $\beta$  dont l'expression semble ubiquitaire. L'expression de PPAR $\alpha$  est particulièrement importante au niveau du foie et le long de la paroi intestinale alors que PPAR $\gamma$  s'exprime principalement dans le tissu adipeux et la rate. Au niveau du système nerveux central les trois sous types ( $\alpha, \beta, \gamma$ ) sont exprimés. Les cellules telles que les oligodendrocytes ainsi que les astrocytes expriment plus particulièrement le sous-type PPAR $\alpha$  (Kainu, Wikstrom et al. 1994).

Les gènes cibles des PPARs contrôlent le métabolisme des lipides et des glucides. Cependant, des découvertes récentes suggèrent que les PPARs participent à d'autres processus biologiques. L'activation des PPARs par leurs ligands induit le changement de l'activité transcriptionnelle de gènes qui modulent le processus inflammatoire, les enzymes antioxydantes, l'angiogénèse, la prolifération et la différenciation cellulaire, l'apoptose, les activités des iNOS, MMPases et TIMPs (Smith, Dipreta et al. 2001; Clark 2002). L'activation de PPAR  $\alpha$  et  $\gamma$  est par exemple responsable de l'arrêt de la prolifération des kératinocytes épidermiques et favorise leur différenciation (Ellis, Varani et al. 2000; Komuves, Hanley et al. 2000).

Les radicaux libres interviennent dans un spectre très large de pathologies comme les allergies, l'initiation et la promotion cancéreuse, les pathologies cardiovasculaires (athérosclérose, ischémie), les désordres génétiques et métaboliques (diabète), les maladies infectieuses et dégénératives (Alzheimer, Parkinson, Prion, etc.) ainsi que les problèmes ophtalmiques (Mates, Perez-Gomez et al. 1999).

Les espèces réactives oxygénées (ROS) sont produites pendant le fonctionnement normal de la cellule. Les ROS sont constituées de radicaux hydroxyle (OH), de l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et de l'oxyde nitrique (NO). Ces espèces sont très labiles et, du fait de leur grande réactivité chimique, elles constituent un danger pour les fonctions biologiques des cellules. Elles provoquent des réactions de peroxydation lipidique, l'oxydation de certains enzymes et des oxydations très importantes des protéines qui mènent à leur dégradation. La protection vis-à-vis de la peroxydation lipidique est un processus essentiel chez les organismes aérobies, car les produits de peroxydation peuvent causer des dommages à l'ADN. Ainsi un dérèglement ou une modification de l'équilibre entre la production, la prise en charge et l'élimination des espèces radicalaires par les défenses antioxydantes naturelles conduisent à la mise en place de processus délétères pour la cellule ou l'organisme.

La prise en charge des ROS se fait via un système antioxydant qui comprend une composante enzymatique et non enzymatique. Le système enzymatique se compose de plusieurs enzymes dont les caractéristiques sont les suivantes :

- La superoxyde dismutase (SOD) détruit le radical superoxyde en le convertissant en peroxyde. Ce dernier est lui même pris en charge par un autre système enzymatique. Un faible niveau de SOD est constamment généré par la respiration aérobie. Trois classes de SOD ont été identifiées chez l'homme, elles contiennent chacune du Cu, Zn, Fe, Mn, ou Ni comme cofacteur. Les trois formes de SOD humaines sont reparties de la manière suivante Cu-Zn SOD qui sont cytosoliques, une Mn-SOD mitochondriale et une SOD extracellulaire.
- La catalase est très efficace pour convertir le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en eau et en  $O_2$ . Le peroxyde d'hydrogène est catabolisé de manière enzymatique dans les organismes aérobies. La catalase catalyse également la réduction d'une variété d'hydroperoxydes (ROOH).
- La glutathion peroxydase contient du sélénium comme cofacteur et catalyse la réduction d'hydroperoxydes (ROOH et  $H_2O_2$ ) en utilisant du glutathion, et protège ainsi les cellules contre les dommages oxydatifs.

Les défenses cellulaires antioxydantes non enzymatiques sont constituées par des molécules qui sont synthétisées ou apportées par l'alimentation.

Il existe des molécules antioxydantes présentes dans différents compartiments cellulaires. Les enzymes détoxifiantes sont par exemple chargées d'éliminer les radicaux libres et sont indispensables à la vie de la cellule. Les trois types de composés antioxydants les plus importants sont les caroténoïdes, la vitamine C et la vitamine E (Gilgun-Sherki, Melamed et al. 2001).

Pour éviter le phénomène d'apoptose induit par l'ischémie cérébrale et ses conséquences secondaires, les inventeurs ont mis au point de nouveaux composés capables de prévenir l'apparition des facteurs de risque décrits ci-dessus et capables d'exercer une activité prophylactique en terme de neuroprotection, mais également d'assurer une neuroprotection active dans la phase aiguë des accidents ischémiques cérébraux.

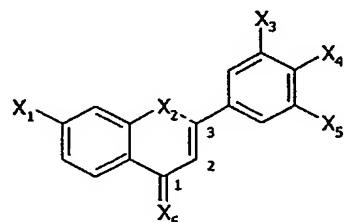
Les inventeurs ont également mis en évidence que les composés selon l'invention ont à la fois des propriétés d'activateurs PPAR, d'antioxydants et d'antiinflammatoires et, à ces titres, les composés présentent un haut potentiel thérapeutique ou prophylactique des accidents ischémiques cérébraux.

La présente invention concerne ainsi de nouveaux dérivés de 1,3-diphénylprop-2-èn-1-one substitués, des compositions pharmaceutiques les comprenant, leurs applications en thérapeutique, notamment pour le traitement de l'ischémie cérébrale. Elle a également trait à un procédé de préparation de ces dérivés.

La présente invention a donc pour but de proposer de nouveaux dérivés de 1,3-diphénylprop-2-èn-1-one substitués présentant une formule améliorée et une efficacité thérapeutique satisfaisante.

La présente invention a également pour but de proposer des procédés de préparation de ces nouveaux dérivés de 1,3-diphénylprop-2-èn-1-one substitués.

Ces buts et d'autres sont atteints par la présente invention qui a notamment pour objet des dérivés de 1,3-diphénylprop-2-èn-1-one substitués de formule (I) suivante :



(I)

dans laquelle :

X1 représente un halogène ou un groupement -R1 ou un groupement répondant à la formule suivante : -G1-R1,

X2 représente un atome d'hydrogène ou un groupement thionitroso ou un groupement hydroxy ou un groupement alkyloxy ou un groupement alkylcarbonyloxy ou un groupement thiol ou un groupement alkylthio ou un groupement alkylcarbonylthio, X2 peut également représenter un atome d'oxygène ou de soufre lié au carbone 3 de la chaîne propène, pour former un dérivé de type 2-phényl-4H-1-benzopyran-4-one (cette possibilité est représentée dans la formule (I) par les pointillés),

5 X3 représente un groupement -R3 ou un groupement répondant à la formule suivante : -G3-R3,

10 X4 représente un halogène ou un groupement thionitroso ou un groupement -R4 ou un groupement répondant à la formule suivante : -G4-R4,

15 X5 représente un groupement -R5 ou un groupement répondant à la formule suivante : -G5-R5,

20 X6 est un atome d'oxygène ou un atome d'azote, dans le cas où X6 est un atome d'azote, il porte un atome d'hydrogène ou un groupement hydroxy ou un groupement alkyloxy,

25 R1, R3, R4, R5, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un groupement alkyle substitué ou non par au moins un groupement faisant partie du groupe 1 ou du groupe 2 définis ci-dessous,

G1, G3, G4, G5, identiques ou différents, représentent un atome d'oxygène ou de soufre,

30 avec au moins un des groupements X1, X3, X4 ou X5 répondant à la formule -G-R, et

avec au moins un des groupements R1, R3, R4 ou R5 présent sous la forme d'un radical alkyle portant au moins un substituant du groupe 1 ou 2, ledit radical alkyle

étant lié directement au cycle ou étant associé à un groupement G selon la formule -GR,

5 les substituants du groupe 1 sont choisis parmi les groupements carboxy de formule : -COOR<sub>6</sub> et les groupements carbamoyle de formule : -CONR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>,

les substituants du groupe 2 sont choisis parmi l'acide sulfonique (-SO<sub>3</sub>H) et les groupements sulfonamide de formule : -SO<sub>2</sub>NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>

10 avec R<sub>6</sub> et R<sub>7</sub>, identiques ou différents, représentant un atome d'hydrogène ou un radical alkyle éventuellement substitué par au moins un groupe de type 1 ou 2,

leurs isomères optiques et géométriques, leurs racémates, leurs tautomères, leurs sels, leurs hydrates et leurs mélanges,

15 à l'exclusion des composés de formule (I) dans laquelle

- X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> et X<sub>5</sub> représentent simultanément un atome d'hydrogène, X<sub>6</sub> représente un atome d'oxygène et X<sub>4</sub> représente un groupement de formule -O-CR<sub>8</sub>R<sub>9</sub>-COOR<sub>10</sub>, avec R<sub>8</sub> et R<sub>9</sub>, identiques ou différents, représentent un radical alkyle de C1-C2, et R<sub>10</sub> représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle de C1-C7, et

- X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> et X<sub>5</sub> représentent simultanément un atome d'hydrogène, X<sub>1</sub> représente un atome d'halogène ou un radical R<sub>1</sub> ou -G<sub>1</sub>R<sub>1</sub>, où R<sub>1</sub> représente un radical alkyle non substitué de C1-C2 et G<sub>1</sub> représente un atome d'oxygène, X<sub>6</sub> représente un atome d'oxygène et X<sub>4</sub> représente un groupement de formule -O-CR<sub>11</sub>R<sub>12</sub>-COOR<sub>10</sub>, avec R<sub>11</sub> et R<sub>12</sub>, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical alkyle de C1-C2, et R<sub>10</sub> représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle de C1-C7.

30 La présente invention inclut également les prodrogues des composés de formule (I), qui, après administration chez un sujet, vont se transformer en composés de formule (I) et/ou les métabolites des composés de formule (I) qui

présentent des activités thérapeutiques comparables aux composés de formule (I).

5 La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant, dans un support acceptable sur le plan pharmaceutique, au moins un composé de formule (I) tel que décrit ci-dessus, éventuellement en association avec un autre actif thérapeutique.

10 Elle concerne aussi l'utilisation d'au moins un composé de formule (I) pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à traiter une pathologie vasculaire cérébrale, tel que l'ischémie cérébrale ou un accident hémorragique cérébral.

15 La présente invention a enfin pour objet un procédé de préparation des composés de formule (I).

Dans le cadre de la présente invention, les dérivés de formule (I) tels que décrits ci-dessus peuvent adopter la conformation cis ou trans.

20 De manière avantageuse, X4 est un groupement thionitroso ou un groupement -R4 ou un groupement répondant à la formule -G4-R4. Les dérivés de la formule (I) dans lesquels X4 répond à la précédente définition représentent les dérivés de formule générale (II) dans laquelle G4 et R4 sont tels que définis précédemment.

25 De manière avantageuse, X2 est un groupement thionitroso ou un groupement hydroxy ou un groupement alkyloxy ou un groupement thiol ou un groupement alkylthio. Les dérivés de la formule (I) dans lesquels X2 répond à la précédente définition représentent les dérivés de formule générale (III).

30 D'autres dérivés avantageux de la formule (I) de l'invention ont une formule générale (IV) telle que X4 est un groupement thionitroso ou un groupement -R4 ou un groupement répondant à la formule -G4-R4 et X2 est un groupement

thionitroso ou un groupement hydroxy ou un groupement alkyloxy ou un groupement thiol ou un groupement alkylthio, G4 et R4 étant tels que définis précédemment.

5           Un autre objet de l'invention concerne des dérivés de la formule (I) tels que décrits précédemment, caractérisés en ce que X1 est un groupement -G1-R1 dans lequel R1 est un groupement alkyle portant un substituant du groupe 1, avec G1 et le substituant du groupe 1 étant tels que définis précédemment.

10           Un autre objet de l'invention concerne des dérivés de la formule (I) tels que décrits précédemment, caractérisés en ce que X4 est un groupement -G4-R4 où R4 est un groupement alkyle portant un substituant du groupe 1, avec G4 et le substituant du groupe 1 étant tels que définis précédemment.

15           Un autre objet de l'invention concerne des dérivés de la formule (I) tels que décrits précédemment, caractérisés en ce que X4 est un groupement -G4-R4, R4 est tel que défini précédemment et X3 ou X5 représente respectivement R3 ou G3R3, d'une part, et R5 ou G5R5, d'autre part, avec R3 ou R5 qui représente un groupement alkyle portant un substituant du groupe 1, ledit substituant du groupe 20 1 étant tel que défini précédemment.

25           Un autre objet de l'invention concerne des dérivés de la formule (I) tels que décrits précédemment, caractérisés en ce que X1 est un groupement -G1-R1 dans lequel G1 est un atome d'oxygène et R1 est un groupement alkyle portant un substituant du groupe 1, ledit substituant du groupe 1 étant tel que défini précédemment.

30           Un autre objet de l'invention concerne des dérivés de la formule (I) tels que décrits précédemment, caractérisés en ce que X4 est un groupement -G4-R4 dans lequel G4 est un atome d'oxygène et R4 est un groupement alkyle portant un substituant du groupe 1, ledit substituant du groupe 1 étant tel que défini précédemment.

Un autre objet de l'invention concerne des dérivés de la formule (I) tels que décrits précédemment, caractérisés en ce que X4 est un groupement  $-G_4-R_4$  dans lequel G4 est un atome d'oxygène, R4 est tel que défini précédemment et X3 ou X5 représente respectivement R3 ou G3R3, d'une part, et R5 ou G5R5, d'autre part, avec R3 ou R5 est un groupement alkyle portant un substituant du groupe 1, ledit substituant du groupe 1 étant tel que défini précédemment.

Un autre objet de l'invention concerne des dérivés de formule (I) dans laquelle au moins un des groupements X1, X3, X4 et X5 comprend une fonction acide ou ester.

Selon la présente invention, le terme "alkyle" désigne plus particulièrement un radical hydrocarboné linéaire, ramifié ou cyclique, halogéné ou non, ayant de 1 à 24, de préférence 1 à 10, atomes de carbone tels que méthyle, éthyle, propyle, isopropyle, butyle, isobutyle, *tert*-butyle, pentyle, néopentyle, *n*-hexyle. Les groupes en C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> ou C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub> sont particulièrement préférés. Les groupes méthyle et éthyle sont tout particulièrement préférés. Les radicaux alkyle peuvent éventuellement être interrompus par un ou plusieurs substituants du groupe 1 ou 2.

20

Le terme thionitroso fait référence à un groupement nitroso lié au cycle aromatique par l'intermédiaire d'un atome de soufre.

25

Le terme halogène représente un atome de chlore ou un atome de brome ou un atome d'iode ou un atome de fluor.

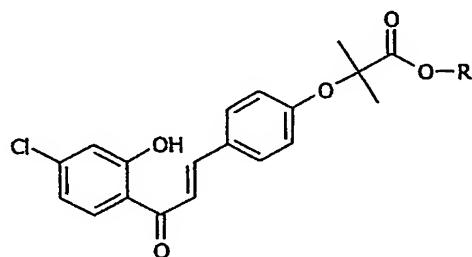
Le terme alkyloxy fait référence à une chaîne alkyle liée au cycle par l'intermédiaire d'un atome d'oxygène. La chaîne alkyle répond à la définition précédemment énoncée.

30

Le terme alkylthio fait référence à une chaîne alkyle liée au cycle aromatique par l'intermédiaire d'un atome de soufre (liaison thioéther). La chaîne alkyle répond à la définition précédemment énoncée.

Selon un mode particulier de l'invention, les composés préférés sont indiqués ci-dessous avec les formules qui leur sont associées :

5 le 1-[2-hydroxy-4-chlorophényl]- 3-[4-carboxydiméthylméthyoxyphényl]prop-2-èn-1-one et le 1-[2-hydroxy-4-chlorophényl]- 3-[4-isopropoxycarbonyldiméthylméthyoxyphényl]prop-2-èn-1-one (composé-1) :

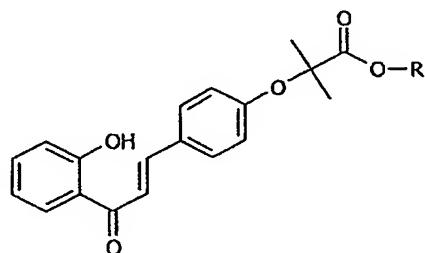


10

$$R = -H, -CH(CH_3)_2$$

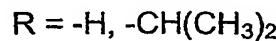
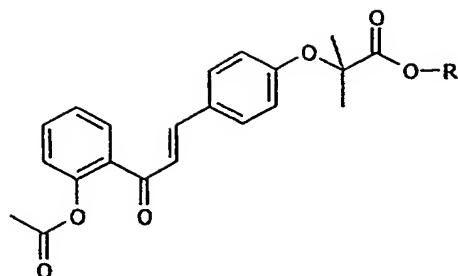
le 1-[2-hydroxyphényl]-3-[4-carboxydiméthylméthyoxyphényl]prop-2-èn-1-one et le 1-[2-hydroxyphényl]-3-[4-isopropoxycarbonyldiméthylméthyoxyphényl]prop-2-èn-1-one (composé-2) :

15

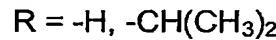
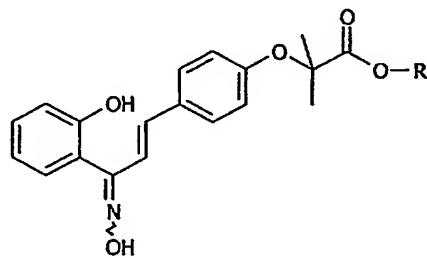


$$R = -H, -CH(CH_3)_2$$

20 le 1-[2-méthylcarbonyloxyphényl]-3-[4-carboxydiméthylméthyoxyphényl]prop-2-èn-1-one et le 1-[2-méthylcarbonyloxyphényl]-3-[4-isopropoxycarbonyldiméthylméthyoxyphényl]prop-2-èn-1-one (composé-3) :

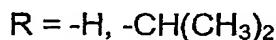
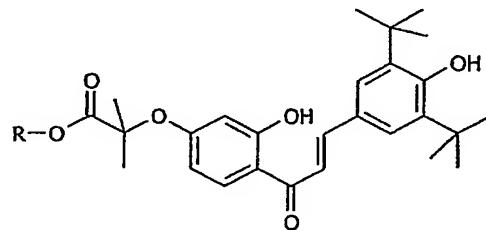


5 le 1-[2-hydroxyphényl]-3-[4-carboxydiméthylméthyoxyphényl]-1-hydroxyiminoprop-2-ène et le 1-[2-hydroxyphényl]-3-[4-isopropoxycarbonyldiméthylméthyoxyphényl]-1-hydroxyiminoprop-2-ène (composé-4) :



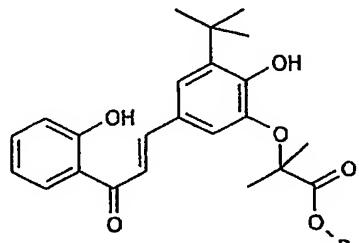
10 le 1-[2-hydroxy-4-carboxydiméthylméthyoxyphényl]-3-[3,5-diterfbutyl-4-hydroxyphényl]prop-2-én-1-one et le 1-[2-hydroxy-4-éthyloxycarbonyldiméthylméthyoxyphényl]-3-[3,5-diterfbutyl-4-hydroxyphényl]prop-2-én-1-one (composé-5) :

15



le 1-[2-hydroxyphényl]-3-[3-carboxydiméthylméthyoxy-4-hydroxy-5-terfbutylphényl]prop-2-én-1-one et le 1-[2-hydroxyphényl]-3-[3-

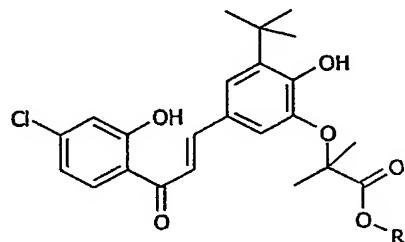
isopropoxycarbonyldiméthylméthyoxy-4-hydroxy-5-*tert*butylphényl]prop-2-èn-1-one (composé-6):



5

$$R = -H, -CH(CH_3)_2$$

le 1-[2-hydroxy-4-chlorophényl]-3-[3-carboxydiméthylméthyoxy-4-hydroxy-5-*tert*butylphényl]prop-2-èn-1-one et le 1-[2-hydroxy-4-chlorophényl]-3-[3-  
10 isopropoxycarbonyldiméthylméthyoxy-4-hydroxy-5-*tert*butylphényl]prop-2-èn-1-one (composé-7) :

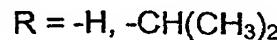
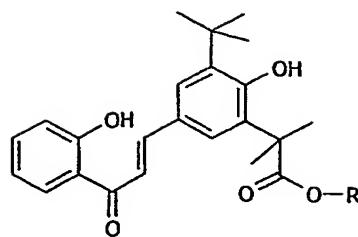


15

$$R = -H, -CH(CH_3)_2$$

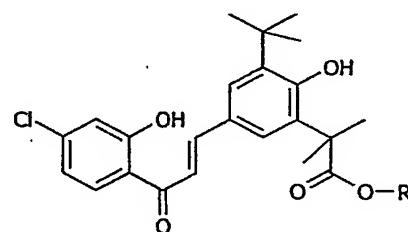
le 1-[2-hydroxyphényl]-3-[3-carboxydiméthylméthyl-4-hydroxy-5-*tert*butylphényl]prop-2-èn-1-one et le 1-[2-hydroxyphényl]-3-[3-isopropoxycarbonyldiméthylméthyl-4-hydroxy-5-*tert*butylphényl]prop-2-èn-1-one (composé-8) :

20



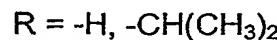
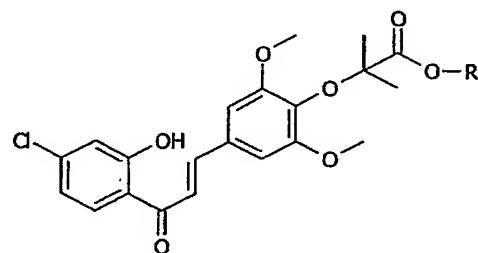
le 1-[2-hydroxy-4-chlorophényl]-3-[3-carboxydiméthylméthyl-4-hydroxy-5-*tert*butylphényl]prop-2-èn-1-one et le 1-[2-hydroxy-4-chlorophényl]-3-[3-isopropoxycarbonyldiméthylméthyl-4-hydroxy-5-*tert*butylphényl]prop-2-èn-1-one (composé-9) :

5



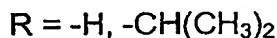
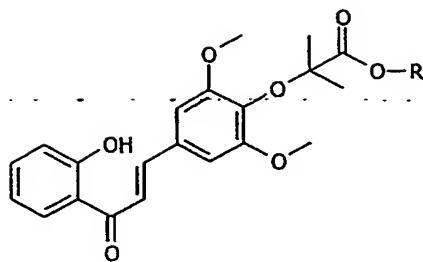
le 1-[2-hydroxy-4-chlorophényl]-3-[3,5-diméthoxy-4-carboxydiméthylméthoxyphényl]prop-2-èn-1-one et le 1-[2-hydroxy-4-chlorophényl]-3-[3,5-diméthoxy-4-isopropoxycarbonyldiméthylméthoxyphényl]prop-2-èn-1-one (composé-10) :

15

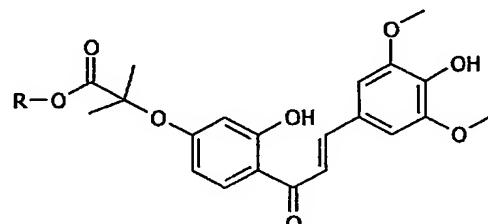


le 1-[2-hydroxyphényl]-3-[3,5-diméthoxy-4-carboxydiméthylméthoxyphényl]prop-2-èn-1-one et le 1-[2-hydroxyphényl]-3-[3,5-diméthoxy-4-isopropoxycarbonyldiméthylméthoxyphényl]prop-2-èn-1-one (composé-11) :

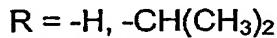
20



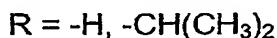
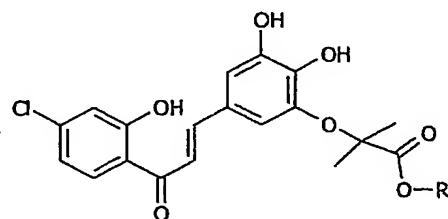
le 1-[2-hydroxy-4-carboxydiméthylméthyoxyphényl]-3-[3,5-diméthoxy-4-hydroxyphényl]prop-2-èn-1-one et le 1-[2-hydroxy-4-isopropyloxycarbonyldiméthylméthyoxyphényl]-3-[3,5-diméthoxy-4-hydroxyphényl]prop-2-èn-1-one (composé-12):



10



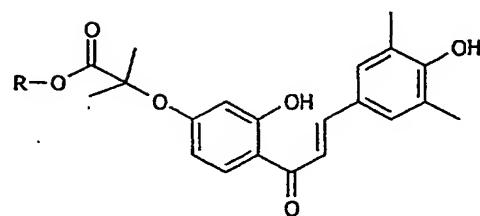
le 1-[2-hydroxy-4-chlorophényl]-3-[3,4-dihydroxy-5-carboxydiméthylméthyoxyphényl]prop-2-èn-1-one et le 1-[2-hydroxy-4-chlorophényl]-3-[3,4-dihydroxy-5-isopropyloxycarbonyldiméthylméthyoxyphényl]-2-propen-1-one (composé-13) :



20 le 1-[2-hydroxy-4-carboxydiméthylméthyoxyphényl]-3-[3,5-diméthyl-4-hydroxyphényl]prop-2-èn-1-one et le 1-[2-hydroxy-4-isopropyloxycarbonyl

diméthylméthoxyphényl]- 3-[3,5-diméthyl-4-hydroxyphényl]prop-2-ène-1-one  
(composé-14) :

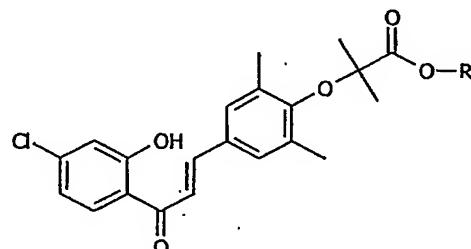
5



$R = -H, -CH(CH_3)_2$

le 1-[2-hydroxy-4-chlorophényl]-3-[3,5-diméthyl-4-carboxydiméthylméthyl  
oxyphényl]prop-2-ène-1-one et le 1-[2-hydroxy-4-chlorophényl]-3-[3,5-diméthyl-4-  
isopropyloxycarbonyldiméthylméthoxy phényl]prop-2-ène-1-one (composé-15) :

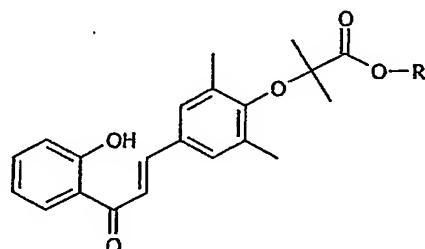
10



$R = -H, -CH(CH_3)_2$

et le 1-[2-hydroxyphényl]-3-[3,5-diméthyl-4-carboxydiméthylméthoxyphényl]prop-  
2-ène-1-one et le 1-[2-hydroxyphényl]-3-[3,5-diméthyl-4-isopropyloxycarbonyl  
diméthylméthoxyphényl]prop-2-ène-1-one (composé-16) :

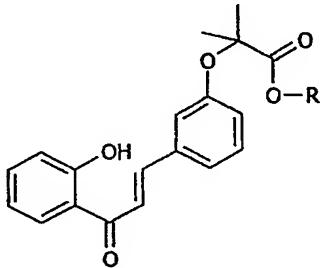
15



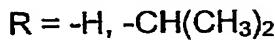
$R = -H, -CH(CH_3)_2$

20

et le 1-[2-hydroxyphényl]-3-[3-carboxydiméthylméthyoxyphényl]prop-2-èn-1-one et le 1-[2-hydroxyphényl]-3-[3-isopropoxyoxycarbonyldiméthylméthyoxyphényl]prop-2-èn-1-one (composé-17) :

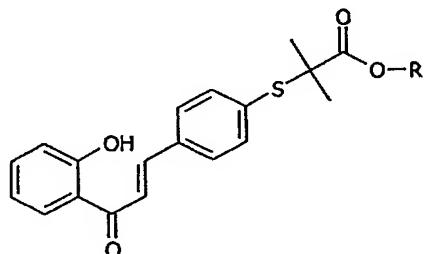


5



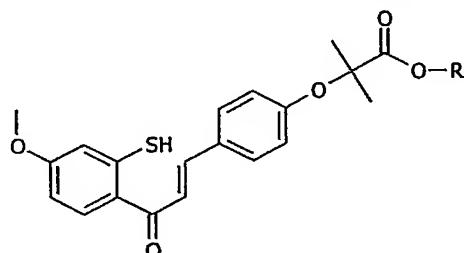
le 1-[2-hydroxyphényl]-3-[4-carboxydiméthylthiophényl]prop-2-èn-1-one et le 1-[2-hydroxyphényl]-3-[4-isopropoxyoxycarbonyldiméthylthiophényl]prop-2-èn-1-one (composé-18) :

10



le 1-[2-mercaptop-4-méthyoxyphényl]-3-[4-carboxydiméthylméthyoxyphényl]prop-2-èn-1-one et le 1-[2-mercaptop-4-méthyoxyphényl]-3-[4-isopropoxyoxycarbonyldiméthylméthyoxyphényl]prop-2-èn-1-one (composé-19) :

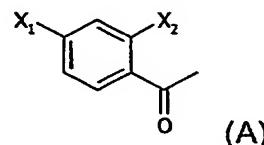
15



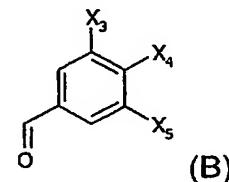
La présente invention a également pour objet un procédé de préparation de composés de formule (I).

Ce procédé de préparation présente de nombreux avantages. Il est simple à mettre en œuvre industriellement et permet d'obtenir un rendement élevé en composés de formule (I).

5 Le procédé de la présente invention comprend une mise en contact en milieu basique ou en milieu acide d'au moins un composé de formule (A) avec au moins un composé de formule (B), les formules (A) et (B) étant :



10



formules dans lesquelles X1, X2, X3, X4 et X5 ont les définitions données précédemment.

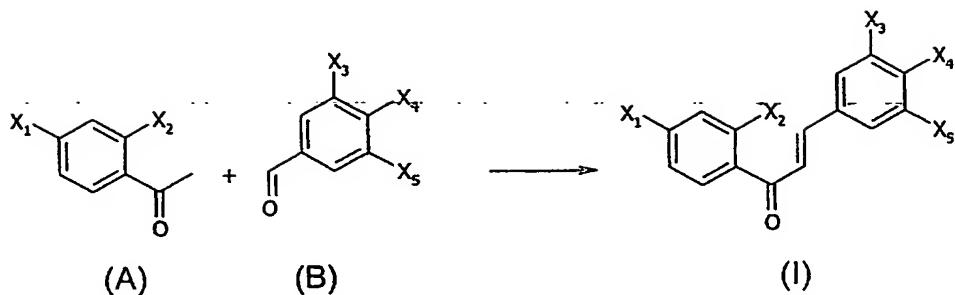
15 Les conditions de mise en œuvre de cette réaction en milieu acide ou basique sont à la portée de l'homme du métier et peuvent varier dans une large mesure.

20 La mise en contact de ces deux composés est avantageusement réalisée de manière stœchiométrique. Elle est réalisée de préférence à une température ambiante (entre environ 18°C et 25°C) et à pression atmosphérique.

En milieu basique, la réaction est de préférence réalisée en présence d'une base forte, tel qu'un hydroxyde de métal alcalin, comme l'hydroxyde de sodium.

25 En milieu acide, la réaction est de préférence réalisée en présence d'un acide fort, tel que l'acide chlorhydrique.

Le schéma réactionnel peut être représenté comme suit :



5 La synthèse en milieu basique peut être réalisée de la façon suivante :

La cétone (composé (A)) à 1 équivalent-molaire et l'aldéhyde (composé (B)) à 1 équivalent-molaire sont solubilisés dans une solution hydroalcoolique d'hydroxyde de sodium à 20 équivalents-molaire. L'ensemble est agité pendant environ 18 10 heures à température ambiante (entre 18 et 25°C). Le milieu est ensuite acidifié (pour atteindre en particulier un pH d'environ 2) notamment avec de l'acide chlorhydrique.

La 1,3-diphénylprop-2-én-1-one substituée attendue peut être obtenue par précipitation ou extraction solide/liquide après évaporation du milieu réactionnel. 15 Elle peut ensuite être purifiée par chromatographie sur gel de silice ou par recristallisation.

La synthèse en milieu acide peut être réalisée de la façon suivante :

20 La cétone (composé (A)) à 1 équivalent-molaire et l'aldéhyde (composé (B)) à 1 équivalent-molaire sont solubilisés dans une solution d'éthanol saturée d'acide chlorhydrique gazeux. L'ensemble est agité à température ambiante pendant environ 6 heures, le solvant est éliminé, notamment par évaporation sous pression réduite. La 1,3-diphénylprop-2-én-1-one substituée est purifiée, notamment par 25 chromatographie sur gel de silice.

Un autre objet de la présente invention concerne toute composition pharmaceutique comprenant dans un support acceptable sur le plan pharmaceutique au moins un composé de formule (I) tel que décrit ci-dessus.

Il s'agit avantageusement d'une composition pharmaceutique pour le traitement ou la prophylaxie des pathologies vasculaires cérébrales et plus particulièrement de l'ischémie cérébrale ou des accidents vasculaires cérébraux. Il 5 a en effet été trouvé de manière surprenante que les composés de formule (I) possédaient à la fois des propriétés d'activateurs PPAR, d'antioxydants et d'anti-inflammatoires et possédaient une activité prophylactique et neuroprotective aiguë de l'ischémie cérébrale.

10 L'invention concerne également l'utilisation d'un composé tel que défini ci-avant pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à la mise en œuvre d'une méthode de traitement ou de prophylaxie du corps humain ou animal.

15 L'invention concerne également une méthode de traitement des pathologies vasculaires cérébrales et plus particulièrement de l'ischémie cérébrale, comprenant l'administration à un sujet, notamment humain, d'une dose efficace d'un composé ou d'une composition pharmaceutique tels que définis ci-avant, y compris les composés de formule générale (I) dans laquelle :

20 -  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  et  $X_5$  représentent simultanément un atome d'hydrogène,  $X_6$  représente un atome d'oxygène et  $X_4$  représente un groupement de formule  $-O-CR_8R_9-COOR_{10}$ , avec  $R_8$  et  $R_9$ , identiques ou différents, représentent un radical alkyle de C1-C2, et  $R_6$  représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle de C1-C7, et

25 -  $X_2$ ,  $X_3$  et  $X_5$  représentent simultanément un atome d'hydrogène,  $X_1$  représente un atome d'halogène ou un radical  $R_1$  ou  $-G_1R_1$ , où  $R_1$  représente un radical alkyle non substitué de C1-C2 et  $G_1$  représente un atome d'oxygène,  $X_6$  représente un atome d'oxygène et  $X_4$  représente un groupement de formule  $-O-CR_{11}R_{12}-COOR_{10}$ , avec  $R_{11}$  et  $R_{12}$ , identiques ou différents, représentent un atome 30 d'hydrogène ou un radical alkyle de C1-C2, et  $R_{10}$  représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle de C1-C7.

De préférence, la méthode de traitement des pathologies vasculaires cérébrales et plus particulièrement de l'ischémie cérébrale, comprend l'administration à un sujet, notamment humain, d'une dose efficace d'un composé de formule (I) ou d'une composition pharmaceutique tels que définis ci-avant, à l'exclusion des composés de formule générale (I) dans laquelle :

-  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  et  $X_5$  représentent simultanément un atome d'hydrogène,  $X_6$  représente un atome d'oxygène et  $X_4$  représente un groupement de formule  $-O-CR_8R_9-COOR_{10}$ , avec  $R_8$  et  $R_9$ , identiques ou différents, représentent un radical alkyle de C1-C2, et  $R_6$  représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle de C1-C7, et

-  $X_2$ ,  $X_3$  et  $X_5$  représentent simultanément un atome d'hydrogène,  $X_1$  représente un atome d'halogène ou un radical R1 ou  $-G_1R_1$ , où R1 représente un radical alkyle non substitué de C1-C2 et G1 représente un atome d'oxygène,  $X_6$  représente un atome d'oxygène et  $X_4$  représente un groupement de formule  $-O-CR_{11}R_{12}-COOR_{10}$ , avec  $R_{11}$  et  $R_{12}$ , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical alkyle de C1-C2, et  $R_{10}$  représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle de C1-C7.

Les compositions pharmaceutiques selon l'invention comprennent avantageusement un ou plusieurs excipients ou véhicules, acceptables sur le plan pharmaceutique. On peut citer par exemple des solutions salines, physiologiques, isotoniques, tamponnées, etc., compatibles avec un usage pharmaceutique et connues de l'homme du métier. Les compositions peuvent contenir un ou plusieurs agents ou véhicules choisis parmi les dispersants, solubilisants, stabilisants, conservateurs, etc. Des agents ou véhicules utilisables dans des formulations (liquides et/ou injectables et/ou solides) sont notamment la méthylcellulose, l'hydroxyméthylcellulose, la carboxyméthylcellulose, le polysorbate 80, le mannitol, la gélatine, le lactose, des huiles végétales, l'acacia, etc.. Les compositions peuvent être formulées sous forme de suspension injectable, de gels, huiles, comprimés, suppositoires, poudres, gélules, capsules, etc., éventuellement au moyen de formes galéniques ou de dispositifs assurant une libération prolongée et/ou retardée. Pour ce type de formulation, on utilise avantageusement un agent tel que la cellulose, des carbonates ou des amidons.

Les composés ou compositions selon l'invention peuvent être administrés de différentes manières et sous différentes formes. Ainsi, ils peuvent être injectés par voie orale ou systémique, comme par exemple par voie intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, trans-dermique, intra-artérielle, etc.. Pour les injections, les composés sont généralement conditionnés sous forme de suspensions liquides, qui peuvent être injectées au moyen de seringues ou de perfusions, par exemple. Il est entendu que le débit et/ou la dose injectée peuvent être adaptés par l'homme du métier en fonction du patient, de la pathologie, du mode d'administration, etc.. Typiquement, les composés sont administrés à des doses pouvant varier entre 1 µg et 2g /administration, préférentiellement de 0,1 mg à 1 g /administration. Les administrations peuvent être quotidiennes ou répétées plusieurs fois par jour, le cas échéant. D'autre part, les compositions selon l'invention peuvent comprendre, en outre, d'autres agents ou principes actifs.

15

## LEGENDES DES FIGURES

Figure 1 :Evaluation des propriétés antioxydantes du composé-2 sur l'oxydation des LDL par le dihydrochloride d'azobis (2-amidinopropane) (AAPH)

20

Sur la figure 1-a sont représentés les résultats de l'expérience mesurant la formation de diènes conjugués en fonction du temps. On peut observer que l'incubation des LDL avec le composé-2, à des concentrations de  $10^{-3}M$  et  $10^{-4}M$ , retarde la formation de diènes conjugués. La Lag-Phase est de 22,6 minutes pour l'AAPH seul, alors que le délai d'apparition des diènes conjugués passe à 92 minutes lorsque les LDL sont incubés avec le composé-2 à  $10^{-3}M$  et à 61,2 minutes à  $10^{-4}M$ . Ce retard de formation de diènes conjugués est caractéristique de produits antioxydants.

25

La figure 1-b représente la vitesse de formation des diènes en fonction des différents traitements. L'incubation du composé-2 avec les LDL en présence de AAPH ralentit la vitesse de formation des diènes conjugués. La vitesse de formation des diènes conjugués est de 0,85 nmol/min/mg de LDL avec l'AAPH

30

seul, cette vitesse est diminuée de 80% (0,17 nmol/min/mg de LDL) avec le composé-2 à  $10^{-3}$ M et de 20% (0,68 nmol/min/mg de LDL) à  $10^{-4}$ M.

La Figure 1-c représente la quantité maximum de diènes conjugués formée au cours du temps. L'incubation des LDL avec l'AAPH entraîne la formation 180 nmol/mg de LDL de diènes conjugués, l'incubation avec le composé-2 à  $10^{-3}$ M diminue de 33% la formation de diènes conjugués (120 nmol/mg de LDL).

Figure 2 :Evaluation des propriétés antioxydantes du composé-5 sur l'oxydation des LDL par le dihydrochloride d'azobis (2-amidinopropane) (AAPH)

Sur la figure 2-a sont représentés les résultats de l'expérience mesurant la formation de diènes conjugués en fonction du temps. On peut observer que l'incubation des LDL avec le composé-5, à des concentrations de  $10^{-4}$ M,  $10^{-5}$ M et  $10^{-6}$ M retardé la formation de diènes conjugués. La Lag-Phase est de 134,1 minutes pour l'AAPH seul, alors que le délai d'apparition des diènes conjugués dépasse les 480 minutes (de la mesure expérimentale), lorsque les LDL sont incubés avec le composé-5 à  $10^{-4}$ M. L'incubation avec le composé-5 à  $10^{-5}$ M décale la Lag-Phase à 327,1 minutes et à  $10^{-6}$ M cette valeur atteint 193,5 minutes. Ce retard de formation de diènes conjugués est caractéristique de produits antioxydants.

La figure 2-b représente la vitesse de formation des diènes en fonction des différents traitements. L'incubation du composé-5 avec LDL en présence de AAPH ralentit la vitesse de formation des diènes conjugués. La vitesse de formation des diènes conjugués est de 1,22 nmol/min/mg de LDL avec l'AAPH seul, cette vitesse est non déterminée (non mesurable car trop faible) avec le composé-5 à  $10^{-4}$ M, elle est diminuée de 53% (0,58 nmol/min/mg de LDL) avec le composé-5 à  $10^{-5}$ M et elle est réduite de 8% avec le composé-5 à  $10^{-6}$ M (1,12 nmol/min/mg de LDL).

La Figure 2-c représente la quantité maximum de diènes conjugués formée au cours du temps. L'incubation des LDL avec l'AAPH entraîne la formation de 555 nmol/mg de LDL de diènes conjugués, l'incubation avec le composé-5 à  $10^{-4}$ M

diminue de 83% la formation de diènes conjugués (97 nmol/mg de LDL), de 72% (157 nmol/mg de LDL) à  $10^{-5}$ M et de 9% (507 nmol/mg de LDL) à  $10^{-6}$ M.

5 Figure 3 :Evaluation des propriétés antioxydantes du composé-5 sur l'oxydation des LDL par le cuivre (Cu)

Sur la figure 3-a sont représentés les résultats de l'expérience mesurant la formation de diènes conjugués en fonction du temps. On peut observer que l'incubation des LDL avec le composé-5, à des concentrations de  $10^{-4}$ M,  $10^{-5}$ M et  $10^{-6}$ M retardé la formation de diènes conjugués. La Lag-Phase est de 72,9 minutes pour le cuivre seul alors que le délai d'apparition des diènes conjugués dépasse les 480 minutes (de la mesure expérimentale) lorsque les LDL sont incubés avec le composé-5 à  $10^{-4}$ M. Le composé-5 à  $10^{-5}$ M décale la Lag-Phase à 333,2 minutes et à  $10^{-6}$ M à 142,6 minutes. Ce retard de formation de diènes conjugués est caractéristique de produits antioxydants.

20 La figure 3-b représente la vitesse de formation des diènes en fonction des différents traitements. L'incubation du composé-5 avec les LDL en présence de cuivre ralentit la vitesse de formation des diènes conjugués. La vitesse de formation des diènes conjugués est de 4 nmol/min/mg de LDL avec le cuivre seul, cette vitesse est non déterminée avec le composé-5 à  $10^{-4}$ M (non mesurable car trop faible), elle est diminuée de 87,5% (0,5 nmol/min/mg de LDL) à  $10^{-5}$ M et de 12,5% à  $10^{-6}$ M (3,5 nmol/min/mg de LDL).

25 La Figure 3-c représente la quantité maximum de diènes conjugués formée au cours du temps. L'incubation des LDL avec le cuivre entraîne la formation 555 nmol/mg de LDL de diènes conjugués, l'incubation avec le composé-5 à  $10^{-4}$ M diminue de 83% la formation de diènes conjugués (97 nmol/mg de LDL), de 72% (157 nmol/mg de LDL) à  $10^{-5}$ M et 9% (507 nmol/mg de LDL) à  $10^{-6}$ M.

30

Figure 4 : évaluation des propriétés d'agoniste PPAR $\alpha$  des composés selon l'invention avec le système de transactivation PPAR $\alpha$ /Gal4.

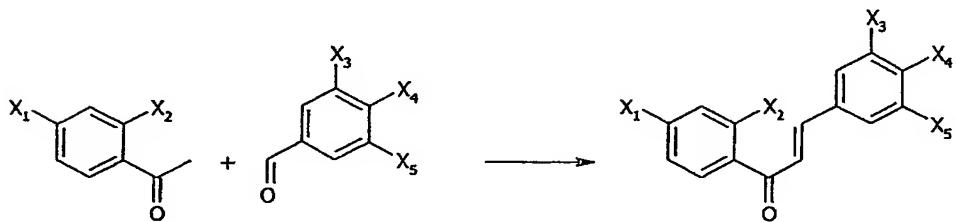
Les cellules RK13 sont incubées avec différents composés aux concentrations suivantes 10, 30 et 100  $\mu\text{M}$ , pendant 24h. Les résultats sont représentés par le facteur d'induction (signal luminescent par rapport aux cellules non traitées) en fonction des différents traitements. Plus le facteur d'induction est élevé meilleure est la propriété d'agoniste pour PPAR $\alpha$ . Les résultats montrent que le composé-1 permet l'induction d'un facteur 30 aux concentrations utilisées, le composé-2 a un facteur d'induction maximal de 60 à 100  $\mu\text{M}$  de 22 à 30  $\mu\text{M}$  et de 4 à 10  $\mu\text{M}$ . Le composé-10 active le système avec un facteur d'induction de 10 pour les concentrations 10 et 30  $\mu\text{M}$ . Le composé-11 possède un facteur d'induction de 10 pour la plus forte concentration 100  $\mu\text{M}$ , de 5 à 30  $\mu\text{M}$  et de 3 à 10  $\mu\text{M}$ . Le composé-15 permet l'activation du système avec un facteur de 37 à 100  $\mu\text{M}$ , 50 à 30  $\mu\text{M}$  et 35 à 10  $\mu\text{M}$ . Le composé 17 à un facteur d'induction de 28 à 100  $\mu\text{M}$  mais à 30  $\mu\text{M}$  ce dernier est de 5 et à 10  $\mu\text{M}$  il atteint 2.

Ces résultats montrent que les composés selon l'invention testés possèdent la propriété de ligand vis-à-vis de PPAR $\alpha$  et permettent aussi son activation au niveau transcriptionnel.

D'autres aspects et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

## EXEMPLES

### 25 EXEMPLE 1 : Synthèse des composés selon l'invention



Synthèse en milieu basique :

La cétone (1 éq) et l'aldéhyde (1 éq) sont solubilisés dans une solution hydroalcoolique d'hydroxyde de sodium (20 éq). L'ensemble est agité 18 heures à température ambiante. Le milieu est acidifié (pH = 2) avec de l'acide chlorhydrique.

La 1,3-diphénylprop-2-èn-1-one substituée attendue est obtenue par précipitation ou extraction solide liquide après évaporation du milieu réactionnel. Elle est purifiée par chromatographie sur gel de silice ou par recristallisation.

1-[2-hydroxy-4-chlorophényl]-3-[4-carboxydiméthylméthoxyphényl]prop-2-èn-1-one :

Purification : Recristallisation dans l'éthanol

RMN 1H CDCl<sub>3</sub> δppm : 1.57 (s, 6 H), 6.8 (d, J = 8.55Hz, 2H), 7.1 (m, 2H), 7.8 (m, 4H), 8.24 (d, J = 8.52 Hz, 2 H), 12.8 (signal, 1H), 13.3 (signal, 1H)

Exemple de préparation d'une 1,3-diphénylprop-2-èn-1-one substituée sous forme ester à partir de l'acide correspondant :

20

La 1,3-diphénylprop-2-èn-1-one substituée sous forme acide (1 éq) est solubilisée dans le dichlorométhane. Le dichlorométhylméthylether (3 éq) est ajouté ; L'ensemble est maintenu 8 heures à reflux. Le solvant et l'excès de réactif sont éliminés par évaporation sous pression réduite. Le résidu d'évaporation est repris par de l'isopropanol (50 éq). Après 12 heures d'agitation à température ambiante, l'isopropanol est éliminé par évaporation sous pression réduite. La 1,3-diphénylprop-2-èn-1-one substituée sous forme ester pure est obtenue par purification sur gel de silice.

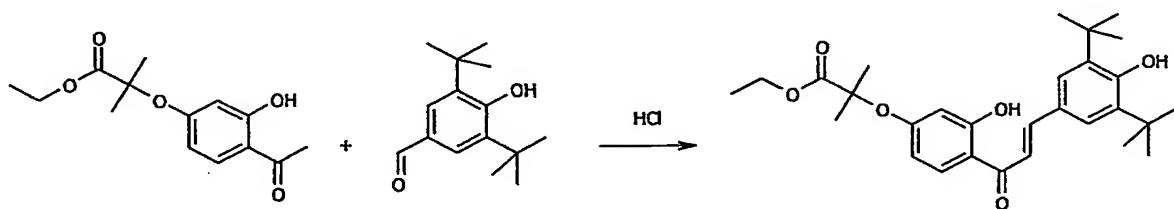
30

Exemple : 1-[2-hydroxy-4-chlorophényl]-3-[4-isopropoxycarbonyldiméthylméthoxyphényl]prop-2-èn-1-one :

RMN 1H CDCl<sub>3</sub> δppm : 1.21 (d, 6H, J = 6.09Hz), 1.65 (s, 6 H), 5.10 (m, 1H), 6.86 (d, J = 8.65Hz, 2H), 6.95 (m, 1H), 7.02 (dd, J=8.65Hz, J = 1.53Hz, 1H), 7.48 (m, 1H), 7.54 (d, J=15.25Hz, 1H), 7.57 (d, J=8.65Hz), 7.87 (d, J=15.25Hz, 1H), 7.93 (d, J = 8.40 Hz, 1 H), 12.94 (signal échangeable D<sub>2</sub>O, 1H)

5

Synthèse en milieu acide :



10 1-[2-hydroxy-4-éthoxycarbonyldiméthylméthoxyphényl]-3-[3,5-di-tertbutyl4-hydroxyphényl]prop-2-èn-1-one :

La cétone (1 éq) et l'aldéhyde (1 éq) sont solubilisés dans une solution d'éthanol saturée d'acide chlorhydrique gazeux. L'ensemble est agité à température ambiante pendant 6h puis le solvant est éliminé par évaporation sous pression réduite. La 1,3-diphénylprop-2-èn-1-one est purifiée par chromatographie sur gel de silice.

20 RMN 1H CDCl<sub>3</sub> δppm : 1.26 (t, J = 7.11, Hz 3 H), 1.45 (s, 18H), 1.7 (s, 6H), 4.25 (q, J = 7.11 Hz), 5.62 (signal 1H), 6.33 (d, J = 2.37, 1H), 6.42 (dd, J = 2.37 et 8.88 Hz, 1H), 7.40 (d, J = 15.4 Hz, 1H), 7.50 (s, 2H), 7.82 (d, J = 8.88 Hz, 1H ), 7.88 (d, J = 15.4 Hz, 1H).

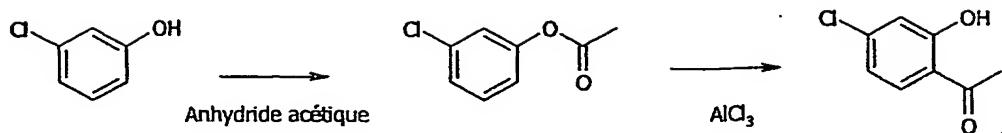
Bibliographie : Adams *et al*, J Org Chem, 1967, 3992-3998

Préparation des matières premières spécifiques :

25

1-Cétones :

4'-chloro-2'-hydroxyacétophénone :



## Acétate de 3-chlorophényle

Le 3-chlorophénol est solubilisé dans le dichlorométhane. La triéthylamine (1éq) et l'anhydride acétique(2 éq) sont ajoutés. L'ensemble est agité 5 heures à température ambiante. Le solvant est éliminé par évaporation sous pression réduite. Le résidu d'évaporation est repris par du dichlorométhane. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium. Le solvant est éliminé par évaporation sous pression réduite. L'acétate de 3-chlorophényle brut est utilisé pour la réaction suivante.

RMN 1H CDCl<sub>3</sub> δppm: 2.29 (s, 3 H), 6.99-7.33 (m, 4 H)

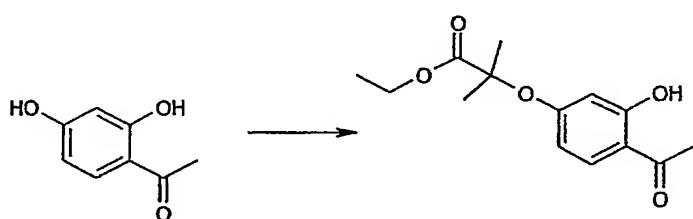
## 4'-Chloro-2'-hydroxyacétophénone

15 L'acétate de 3-chlorophényle est mélangé au chlorure d'aluminium (3 éq), le mélange est chauffé 1 heures à 200°C. Le milieu réactionnel est ramené à température ambiante puis versé dans la glace. La phase aqueuse est extraite par du chlorure de méthylène, la phase organique est séchée sur sulfate de magnésium. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice.

20 RMN 1H CDCl<sub>3</sub> δppm: 3.41 (s, 3 H), 6.81 (dd, J = 8.82Hz, 1H), 6.91 (s, 1H), 7.60 (d, 8.82Hz, 1 H), 12.33 (s, 1H)

Bibliographie : Chen et al, J Chem Soc, 1958, 146-148.

## 2'-Hydroxy-4'-(éthoxycarbonyldiméthylméthoxy)acétophénone :



La 2',4'-dihydroxyacétophénone est solubilisée dans de l'acétone anhydre, le carbonate de potassium (2 éq) puis le 2-bromo-2-méthylpropanoate d'éthyle (1 éq)

sont ajoutés. L'ensemble est maintenu 24 heures sous vive agitation à reflux. L'avancement de la réaction est suivi par chromatographie sur couche mince. Le milieu réactionnel est ramené à température ambiante, les sels sont éliminés par filtration. La 2'-Hydroxy-4'-(éthoxycarbonyldiméthylméthoxy)acétophénone pure

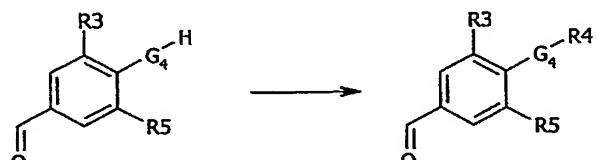
5 est obtenue par chromatographie sur gel de silice.

RMN 1H CDCl<sub>3</sub> δppm : 1.25 (t, J = 7.17 Hz, 3H), 1.67 (s, 6H), 2.56 (s, 3H), 4.24 (q, J = 7.17, 2H), 6.27 (d, J = 2.55 Hz, 1H), 6.37 (dd, J = 2.55 Hz, J = 8.72 Hz, 1H), 7.62 (d, J = 8.72, 1H), 12,6 (signal, 1H).

10 Bibliographie : Brevet US n° 3,629,290 (1970), Fisons Pharmaceutical

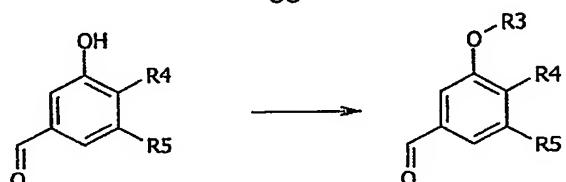
2-Aldéhydes :

15



R3, R5 = H, CH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>, G<sub>4</sub> = O, S  
R4 = C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

OU



20

R4, R5 = H  
R3 = C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

25

L'aldéhyde est solubilisé dans de l'acétone anhydre. Le carbonate de potassium est ajouté (2 éq) puis le 2-bromo-2-méthylpropanoate d'éthyle (2 éq). Le milieu réactionnel est maintenu 18 heures sous agitation à reflux. L'avancement de la réaction est suivi par chromatographie sur couche mince. Une fois la réaction terminée, le milieu est ramené à température ambiante, les sels sont éliminés par

30

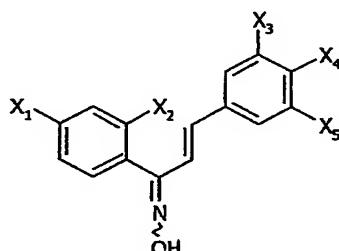
filtration. Le solvant est éliminé par évaporation sous pression réduite. Le résidu est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice.

Exemple : 4-(Ethoxycarbonyldiméthylméthoxy)benzaldéhyde :

RMN  $^1$ H CDCl<sub>3</sub> δppm: 1.21 (t, J = 6.96Hz, 3 H), 1.67 (s, 6H), 4.21 (q, 6.96 2H).

5 6.88 (d,  $J$  = 8.91Hz, 2 H), 7.77 (d,  $J$  = 8.94Hz, 2 H), 9.87 (s, 1H)

### 1,3-diphénylprop-1-hydroxyiminoprop-2-ène :



La 1,3-diphénylprop-2-èn-1-one substituée est solubilisée dans du méthanol. La pyridine est ajoutée (4 éq) puis le chlorhydrate d'hydroxylamine. Le milieu réactionnel est porté à léger reflux, l'avancement de la réaction est suivi par chromatographie sur couche mince. Une fois la réaction terminée, le solvant est éliminé par évaporation sous pression réduite. Le résidu est repris par du dichlorométhane. La phase organique est lavée par une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 0,1 N puis avec de l'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis le chlorure de méthylène est éliminé par évaporation sous pression réduite. Le 1,3-diphénylprop-1-hydroxyiminoprop-2-ène substitué pur est obtenu après purification sur gel de silice.

## 20 · EXEMPLE 2 : Evaluation des propriétés antioxydantes des composés selon l'invention

## 1. Protection de l'oxydation des LDL par le cuivre ou le dihydrochloride d'azobis(2-amidinopropane) (AAPH) :

Les composés selon l'invention, possédant une fonction ester ou une fonction acide carboxylique, testés sont les composés dont la préparation est décrite dans les exemples décrits ci-dessus.

5 L'oxydation des LDL est une modification importante et joue un rôle prépondérant dans la mise en place et le développement de l'athérosclérose (Jurgens, Hoff et al. 1987). Le protocole suivant permet la mise en évidence des propriétés antioxydantes des composés. Sauf mention différente, les réactifs proviennent de chez Sigma (St Quentin, France).

10 Les LDL sont préparés suivant la méthode décrite par Lebeau et al. (Lebeau, Furman et al. 2000).

15 Les solutions de composés à tester sont préparées à  $10^{-2}$  M dans de l'éthanol et diluées dans du PBS pour avoir des concentrations finales allant de 0,1 à 100  $\mu$ M pour une concentration totale d'éthanol de 1% (v/v).

20 15 Avant l'oxydation, l'EDTA est retiré de la préparation de LDL par dialyse. L'oxydation a ensuite lieu à 30°C en ajoutant 100  $\mu$ l d'une solution à 16,6  $\mu$ M de CuSO<sub>4</sub> ou de 2 mM de AAPH à 800  $\mu$ L de LDL (125  $\mu$ g de protéines/ml) et 100  $\mu$ l d'une solution du composé à tester. La formation de diènes, l'espèce à observer, se mesure par densité optique à 234 nm dans les échantillons traités avec les composés mais avec ou sans cuivre (ou AAPH). La mesure de la densité optique à 234 nm est réalisée toutes les 10 minutes pendant 8 heures à l'aide d'un spectrophotomètre thermostaté (Kontron Uvikon 930). Les analyses sont réalisées en triplicata. Nous considérons que les composés ont une activité antioxydante lorsqu'ils induisent un décalage de phase par rapport à l'échantillon témoin. Les inventeurs mettent en évidence que les composés selon l'invention, possédant une fonction ester ou une fonction acide carboxylique, retardent l'oxydation des LDL (induite par le cuivre), ceci indiquant que les composés selon l'invention possèdent un caractère antioxydant intrinsèque. Un exemple de résultats est donné sur les figures 1, 2 et 3 où les propriétés antioxydantes des composés 2 et 25 30 5 sont illustrées.

2. Evaluation de la protection conférée par les composés selon l'invention vis-à-vis de la peroxydation lipidique :

Les composés selon l'invention, possédant une fonction ester ou une fonction acide carboxylique, testés sont les composés dont la préparation est décrite dans les exemples décrits ci-dessus.

5 La mesure de l'oxydation des LDL est réalisée par la méthode des TBARS.

Selon le même principe que celui décrit précédemment, les LDL sont oxydés avec du CuSO<sub>4</sub> et la peroxydation lipidique est déterminée de la manière suivante :

10 Les TBARS sont mesurés à l'aide d'une méthode spectrophotométrique, l'hydroperoxydation lipidique est mesurée en utilisant l'oxydation peroxyde-lipide dépendante de l'iodide en iodine. Les résultats sont exprimés en nmol de malondialdehyde (MDA) ou en nmol d'hydroperoxyde/mg de protéines.

15 Les résultats obtenus précédemment, en mesurant l'inhibition de la formation de diènes conjugués, sont confirmés par les expériences de mesure de peroxydation lipidique des LDL. Les composés selon l'invention protègent également de manière efficace les LDL contre la peroxydation lipidique induite par le cuivre (agent oxydant).

20 Exemple 3 : mesure des propriétés antioxydantes des composés selon l'invention sur des culture de cellules

Protocole de culture :

25 Les lignées cellulaires utilisées pour ce type d'expériences sont de type neuronales, neuroblastomes (humains) et cellules PC12 (rat). Les cellules PC12 ont été préparées à partir d'un pheochromocytome de rat et sont caractérisées par Greene et Tischler (Greene and Tischler, 1976). Ces cellules sont couramment utilisées pour des études de différenciation neuronale, transduction du signal et mort neuronale. Les cellules PC12 sont cultivées comme précédemment décrit

(Farinelli, Park et al. 1996), dans du milieu complet RPMI (Invitrogen) complémenté avec 10% de sérum de cheval et 5% de sérum de veau fœtal.

5 Des cultures (primaires) de cellules endothéliales et muscles lisses sont également utilisées. Les cellules sont commandées chez Promocell (Promocell GmbH, Heidelberg) et sont cultivées selon les indications du fournisseur.

Les cellules sont traitées avec différentes doses de composés de 5 à 300 µM pendant 24 heures. les cellules sont alors récupérées et l'augmentation de l'expression des gènes cibles est évaluée par PCR quantitative.

10 Mesure des ARNm :

Les ARNm sont extraits des cellules en culture traitées ou non avec les composés selon l'invention. L'extraction est réalisée à l'aide des réactifs du kit Absolutely RNA RT-PCR miniprep Kit (Stratagene, France) selon les indications du fournisseur. Les ARNm sont ensuite dosés par spectrométrie et quantifiés par RT-15 PCR quantitative à l'aide du kit Light Cycler Fast start DNA Master Sybr Green I kit (Roche) sur un appareil Light Cycler System (Roche, France). Des paires d'amorces spécifiques des gènes de la Super Oxyde Dismutase (SOD), de la Catalase et de la Glutathion Peroxydase (GPx), enzymes anti-oxydantes, sont utilisées comme sondes. Des paires d'amorces spécifiques des gènes β-actine et cyclophiline sont utilisées comme sondes témoin.

20 L'augmentation de l'expression des ARNm, mesurée par RT-PCR quantitative, des gènes des enzymes antioxydantes est mise en évidence dans les différents types cellulaires utilisés, lorsque les cellules sont traitées avec les composés selon l'invention possédant une fonction acide carboxylique.

25

Contrôle du stress Oxydatif :

Mesure des espèces oxydantes dans les cellules en culture :

30 Les propriétés antioxydantes des composés sont également évaluées à l'aide d'un indicateur fluorescent dont l'oxydation est suivie par l'apparition d'un signal fluorescent. La diminution d'intensité du signal fluorescent émis est mesurée dans

les cellules traitées avec les composés de la manière suivante : les cellules PC12 cultivées comme précédemment décrit (plaques noires 96 trous fonds transparents, Falcon) sont incubées avec des doses croissantes de  $H_2O_2$  (0,25 mM → 1 mM) dans du milieu sans sérum pendant 2 et 24 heures. Après l'incubation le milieu est  
5 enlevé et les cellules sont incubées avec une solution de dichlorodihydrofluorescéine diacetate (DCFDA, Molecular Probes, Eugene, USA) 10  $\mu$ M dans du PBS pendant 30 min à 37°C et dans une atmosphère contenant 5% de  $CO_2$ . Les cellules sont ensuite rincées avec du PBS. La détection de la fluorescence émise par l'indicateur de l'oxydation est mesurée à l'aide d'un 10 fluorimètre (Tecan Ultra 384) à une longueur d'onde d'excitation de 495 nm et une longueur d'onde d'émission de 535 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage de protection par rapport au témoin oxydé.

L'intensité de fluorescence est plus faible dans les cellules incubées avec les 15 composés selon l'invention que dans les cellules non traitées. Ces résultats indiquent que les composés selon l'invention, possédant une fonction ester ou une fonction acide carboxylique, favorisent l'inhibition de la production d'espèces oxydantes dans des cellules soumises à un stress oxydatif. Les propriétés antioxydantes décrites précédemment sont également efficaces pour induire une protection antiradicalaire dans des cellules en culture.

20

Mesure de la peroxydation lipidique :

25

L'effet protecteur des composés sur la peroxydation lipidique sur des cultures de cellules (modèles cellulaires cités précédemment) est déterminé de la façon suivante : les différentes lignées cellulaires ainsi que les cellules en culture primaire sont traitées comme précédemment, le surnageant des cellules est récupéré après le traitement et les cellules sont lysées et récupérées pour la détermination de la concentration protéique. La détection de la peroxydation lipidique est déterminée de la manière suivante :

30

La peroxydation lipidique est mesurée à l'aide d'acide thiobarbiturique (TBA) qui réagit avec la lipoperoxydation des aldéhydes tel que le malondialdéhyde (MDA). Après les traitements, le surnageant des cellules est collecté (900  $\mu$ l) et 90  $\mu$ l d'hydroxytoluène butylé y sont ajoutés (Morliere, Moysan et al. 1991). Un ml d'une

solution de TBA à 0,375% dans 0,25M HCL contenant 15% d'acide trichloroacétique est également ajouté aux milieux réactionnels. Le mélange est chauffé à 80°C pendant 15 min, refroidit sur glace et la phase organique est extraite avec du butanol. L'analyse de la phase organique se fait par spectrofluorométrie ( $\lambda_{exc}=515$  nm et  $\lambda_{em}=550$  nm) à l'aide du spectrofluorimètre Shimazu 1501 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japon). Les TBARS sont exprimés en équivalents MDA en utilisant un standard le tetra-ethoxypropane. Les résultats sont normalisés par rapport au contenu en protéines.

La diminution de la peroxydation lipidique observée dans les cellules traitées avec 10 les composés selon l'invention confirme les résultats obtenus précédemment.

Les composés selon l'invention, possédant une fonction ester ou une fonction acide carboxylique, présentent avantageusement des propriétés antioxydantes intrinsèques qui permettent de ralentir et/ou d'inhiber les effets d'un stress oxydatif. Les inventeurs montrent également que les composés selon l'invention 15 sont capables d'induire l'expression des gènes d'enzymes antioxydants. Ces caractéristiques particulières des composés selon l'invention permettent aux cellules de lutter plus efficacement contre le stress oxydatif et donc d'être protégées vis à vis des dommages induits par les radicaux libres.

20 **Exemple 4 : Evaluation de l'activation des PPARs *in vitro* par les composés selon l'invention**

Les composés selon l'invention, possédant une fonction acide carboxylique, testés 25 sont les composés dont la préparation est décrite dans les exemples décrits ci-dessus.

Les récepteurs nucléaires membres de la sous-famille des PPARs qui sont activés par deux classes majeures de composés pharmaceutiques, les fibrates et les glitazones, abondamment utilisées en clinique humaine pour le traitement des dislipidémies et du diabète, jouent un rôle important dans l'homéostasie lipidique 30 et glucidique. Les données expérimentales suivantes montrent que les composés selon l'invention activent PPAR $\alpha$  *in vitro*.

5 L'activation des PPARs est évaluée *in vitro* dans des lignées de type fibroblastique RK13 par la mesure de l'activité transcriptionnelle de chimères constituées du domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal4 de levure et du domaine de liaison du ligand des différents PPARs. Ces derniers résultats sont ensuite confirmés dans des lignées cellulaires selon les protocoles suivants :

L'exemple est donné pour les cellules RK13.

a. Protocoles de culture

10 Les cellules RK13 proviennent de l' ECACC (Porton Down, UK) et sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté de 10% vol/vol sérum de veau foetal, 100 U/ml pénicilline (Gibco, Paisley, UK) et 2 mM L-Glutamine (Gibco, Paisley, UK). Le milieu de culture est changé tous les deux jours. Les cellules sont conservées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub> et 95% d'air.

15

b. Description des plasmides utilisés en transfection

20 Les plasmides pG5TkpGL3, pRL-CMV, pGal4-hPPAR $\alpha$ , pGal4-hPPAR $\gamma$  et pGal4- $\phi$  ont été décrits par Raspe, Madsen et al. (1999). Les constructions pGal4-mPPAR $\alpha$  et pGal4-hPPAR $\beta$  ont été obtenues par clonage dans le vecteur pGal4- $\phi$  de fragments d'ADN amplifiés par PCR correspondants aux domaines DEF des récepteurs nucléaires PPAR $\alpha$  de souris et PPAR $\beta$  humain.

c. Transfection

25 Les cellules RK13 sont ensemencées dans des boîtes de culture de 24 trous à raison de 5x10<sup>4</sup> cellules/trou et sont transfectées pendant 2 heures avec le plasmide rapporteur pG5TkpGL3 (50 ng/trou), les vecteurs d'expression pGal4- $\phi$ , pGal4-mPPAR $\alpha$ , pGal4-hPPAR $\alpha$ , pGal4-hPPAR $\gamma$ , pGal4-hPPAR $\beta$  (100 ng/trou) et le vecteur de contrôle de l'efficacité de transfection pRL-CMV (1 ng/trou) suivant le protocole décrit précédemment (Raspe, Madsen et al. 1999) et incubées pendant 30 36 heures avec les composés testés. A l'issue de l'expérience, les cellules sont

lysées (Gibco, Paisley, UK) et les activités luciférase sont déterminées à l'aide du kit de dosage Dual-Luciferase™ Reporter Assay System (Promega, Madison, WI, USA) selon la notice du fournisseur comme décrit précédemment. Le contenu en protéines des extraits cellulaires est ensuite évalué à l'aide du kit de dosage Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, München, Allemagne) selon la notice du fournisseur.

5 Les inventeurs mettent en évidence une augmentation de l'activité luciférase dans les cellules traitées avec les composés selon l'invention et transfectées avec le plasmide pGal4-hPPAR $\alpha$ . Cette induction de l'activité luciférase indique que les 10 composés selon l'invention, possédant une fonction acide carboxylique, sont des activateurs de PPAR $\alpha$ . Un exemple de résultat obtenu avec différents composés selon l'invention est présenté sur la figure 4.

15 **Exemple 5 : évaluation des propriétés anti-inflammatoires des composés selon l'invention**

La réponse inflammatoire apparaît dans de nombreux désordres neurologiques, 20 comme les scléroses multiples, la maladie d'Alzheimer et de Parkinson, les ischémie cérébrales et les accidents traumatiques du cerveau, de plus l'inflammation est l'un des facteurs importants de la neurodégénérescence. Lors 25 d'accidents cérébraux, une des premières réactions des cellules de la glie est de libérer des cytokines et des radicaux libres. La conséquence de cette libération de cytokines et de radicaux libres est une réponse inflammatoire au niveau cérébral qui peut mener à la mort des neurones (Rothwell 1997).

Les lignées cellulaires et les cellules primaires sont cultivées comme décrit précédemment.

30 Le LPS, endotoxine bactérienne (*Escherichia coli* 0111 :B4) (Sigma, France) est reconstitué dans de l'eau distillée et conservé à 4°C. les cellules sont traitées avec une concentration de LPS de 1  $\mu$ g/ml pendant 24 heures. Pour éviter toutes

interférences avec d'autres facteurs le milieu de culture des cellules est totalement changé.

5 Le TNF- $\alpha$  est un facteur important de la réponse inflammatoire à un stress (oxydant par exemple). Pour évaluer la sécrétion de TNF- $\alpha$  en réponse à une stimulation par des doses croissantes de LPS, le milieu de culture des cellules stimulées est prélevé et la quantité de TNF- $\alpha$  est évaluée avec un kit ELISA-TNF- $\alpha$  (Immunotech, France). Les échantillons sont dilués 50 fois afin d'être en adéquation avec la gamme étalon (Chang, Hudson et al. 2000).

10 La propriété anti-inflammatoire des composés est caractérisée de la manière suivante : le milieu de culture des cellules est totalement changé et les cellules sont incubées avec les composés à tester pendant 2 heures. Après cette incubation, du LPS est rajouté au milieu de culture à une concentration finale de 1  $\mu$ g/ml. Après 24 heures d'incubation, le surnageant de cellules est récupéré et stocké à -80°C lorsqu'il n'est pas traité directement. Les cellules sont lysées et la 15 quantité de protéines est quantifiée, à l'aide du kit de dosage Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, München, Allemagne) selon la notice du fournisseur.

20 La mesure de la diminution de sécrétion de TNF- $\alpha$  favorisée par le traitement avec les composés testés est exprimée en pg/ml/ $\mu$ g de protéine et rapporté en pourcentage par rapport au témoin. Ces résultats montrent que les composés selon l'invention, possédant une fonction ester ou une fonction acide carboxylique, possèdent des propriétés anti-inflammatoires.

Exemple 6 : Evaluation des effets neuro-protecteurs des composés selon l'invention dans un modèle d'ischémie-reperfusion cérébral

25

Modèle Prophylactique :

1/ Traitements des animaux

1.1 Animaux et administration des composés

30 Des souris apolipoprotéine E KO (invalidation du gène de l'apolipoprotéine E), C57Bl6 (sauvages) et PPAR $\alpha$ KO (invalidation du gène du PPAR $\alpha$ ) de 28 à 32 g

ou des rats Wistar ou Sprague Dawley de 200 à 350 g ont été utilisés pour cette expérience.

5 Les animaux sont maintenus sous un cycle lumière/obscurité de 12 h à une température de 20 +/- 3°C. Les animaux ont un accès libre à l'eau et à la nourriture. La prise de nourriture et la prise de poids sont enregistrées.

Les animaux sont traités par gavage avec les composés selon l'invention (200 mg/kg/jour) ou le véhicule (carboxycellulose 0,5% (CMC)), pendant 14 jours avant l'induction de l'ischémie de l'artère moyenne cérébrale.

10 1.2 Induction d'une ischémie-reperfusion par occlusion intraluminale de l'artère moyenne cérébrale :

15 Les animaux ont été anesthésiés à l'aide d'une injection intra-péritonéale de 300 mg/kg d'hydrate de chloral. Une sonde rectale est mise en place et la température du corps est maintenue à 37 +/- 0,5°C. La pression artérielle est mesurée au cours de toute l'expérience.

20 Sous un microscope chirurgical, la carotide droite est mise à jour à l'aide d'une incision cervicale médiale. L'artère ptérygopalatine a été ligaturée à son origine et une artériotomie est réalisée dans l'artère carotide externe afin d'y glisser un mono-filament de nylon. Ce filament est alors doucement avancé dans l'artère carotide commune puis dans l'artère carotide interne afin d'obturer l'origine de l'artère cérébrale moyenne. Après 1 heure, le filament est retiré pour permettre la reperfusion.

## 2/ Mesure du volume de l'infarctus cérébral :

25 24 heures après la reperfusion, les animaux préalablement traités ou non traités avec les composés sont tués par une overdose de pentobarbital.

30 Les cerveaux sont rapidement congelés et sectionnés. Les sections sont colorées au violet Cresyl. Les zones non colorées des sections cérébrales ont été considérées comme lésées par l'infarctus. Les aires ont été mesurées et le volume de l'infarctus et des deux hémisphères ont été calculés par la formule

5 suivante (Volume de l'infarctus corrigé = Volume de l'infarctus - (volume de l'hémisphère droit - volume de l'hémisphère gauche)) pour compenser l'œdème cérébral.

10 L'analyse des coupes de cerveaux d'animaux traités révèle une nette diminution du volume de l'infarctus par rapport aux animaux non traités. Lorsque les composés selon l'invention, possédant une fonction ester ou une fonction acide carboxylique, sont administrés aux animaux avant l'ischémie (effet prophylactique), ils sont capables d'induire une neuroprotection.

15 **3/ mesure de l'activité des enzymes anti-oxydantes :**

20 Les cerveaux des souris sont congelés, écrasés et réduits en poudres puis ressuspension dans une solution saline. Les différentes activités enzymatiques sont ensuite mesurées comme décrits par les auteurs suivants : superoxyde dismutase (Flohe and Otting 1984); glutathion peroxidase (Paglia and Valentine 1967) ; glutathion reductase (Spooner, Delides et al. 1981) ; glutathion-S-transferase (Habig and Jakoby 1981); catalase (Aebi 1984).

25 Les différentes activités enzymatiques mentionnées ci-dessus sont augmentées dans les préparations de cerveaux des animaux traités avec les composés selon l'invention possédant une fonction ester ou une fonction acide carboxylique.

30 **Modèle curatif ou traitement de la phase aiguë**

1/ Induction d'une ischémie-reperfusion par occlusion intraluminale de l'artère moyenne cérébrale.

Des animaux tels que décrits précédemment sont utilisés pour cette expérience. Les animaux sont anesthésiés à l'aide d'une injection intra-péritonéale de 300 mg/kg d'hydrate de chloral. Une sonde rectale est mise en place et la température du corps est maintenue à 37 +/- 0,5°C. La pression artérielle est mesurée au cours de toute l'expérience.

Sous un microscope chirurgical, la carotide droite est mise à jour à l'aide d'une incision cervicale médiale. L'artère ptérygopalatine a été ligaturée à son origine et une artériotomie est réalisée dans l'artère carotide externe afin d'y glisser un mono-filament de nylon. Ce filament est ensuite doucement avancé dans l'artère

carotide commune puis dans l'artère carotide interne afin d'obturer l'origine de l'artère cérébrale moyenne. Après 1 heure, le filament est retiré pour permettre la reperfusion.

5 2/ traitement des animaux :

Les animaux ayant subi une ischémie-reperfusion préalable sont traités par les composés selon l'invention par voie orale ou systémique une ou plusieurs fois après la reperfusion.

10 3/ Mesure du volume de l'infarctus cérébral :

24, 48 ou 72 heures après la reperfusion, les animaux préalablement traités ou non traités avec les composés sont tués par une overdose de pentobarbital.

15 Les cerveaux sont rapidement congelés et sectionnés. Les sections sont colorées au violet Cresyl. Les zones non colorées des sections cérébrales ont été considérées comme lésées par l'infarctus. Les aires ont été mesurées et le volume de l'infarctus et des deux hémisphères ont été calculés par la formule suivante (Volume de l'infarctus corrigé = Volume de l'infarctus - (volume de l'hémisphère droit - volume de l'hémisphère gauche)) pour compenser l'œdème cérébral.

20 Dans les cas d'un traitement curatif (traitement de la phase aiguë), les animaux traités avec les composés selon l'invention, possédant une fonction ester ou une fonction acide carboxylique, ont des dommages au niveau cérébral réduit par rapport aux animaux non traités. En effet le volume de l'infarctus est diminué lorsque les composés selon l'invention sont administrés une ou plusieurs fois 25 après l'ischémie-reperfusion.

30 L'utilisation des composés selon l'invention, possédant une fonction ester ou une fonction acide carboxylique, dans différents modèles expérimentaux montre que ces nouveaux composés possèdent une activité antioxydante intrinsèque, capable de retarder et de réduire les effets d'un stress oxydatif, de plus ils induisent

également l'expression des gènes des enzymes antioxydantes ce qui associé à leur caractère antioxydant permet de renforcer les protections anti-radicalaires de cellules en culture. Par ailleurs les composés selon l'invention possèdent également un pouvoir anti-inflammatoire et la propriété d'activer le récepteur nucléaire PPAR $\alpha$ .

Enfin, l'utilisation des composés selon l'invention, possédant une fonction ester ou une fonction acide carboxylique, dans un modèle d'ischémie reperfusion chez l'animal montre l'effet bénéfique sur la neuroprotection aussi bien avec un traitement préventif que curatif.

## BIBLIOGRAPHIE

Adams, H. P., Jr. (2002). "Emergent use of anticoagulation for treatment of patients with ischemic stroke." Stroke **33**(3): 856-61.

5 Aebi, H. (1984). "Catalase in vitro." Methods Enzymol **105**: 121-6.

Bordet, R., D. Deplanque, et al. (2000). "Increase in endogenous brain superoxide dismutase as a potential mechanism of lipopolysaccharide-induced brain ischemic tolerance." J Cereb Blood Flow Metab **20**(8): 1190-6.

10 Chabrier, P. E., M. Auguet, et al. (1999). "BN 80933, a dual inhibitor of neuronal nitric oxide synthase and lipid peroxidation: a promising neuroprotective strategy." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(19): 10824-9.

Chang, R. C., P. Hudson, et al. (2000). "Influence of neurons on lipopolysaccharide-stimulated production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha by cultured glia." Brain Res **853**(2): 236-44.

15 Clark, R. B. (2002). "The role of PPARs in inflammation and immunity." J Leukoc Biol **71**(3): 388-400.

Dmagi, U., C. Iadecola, et al. (1999). "Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view." Trends Neurosci **22**(9): 391-7.

20 Ellis, C. N., J. Varani, et al. (2000). "Troglitazone improves psoriasis and normalizes models of proliferative skin disease: ligands for peroxisome proliferator-activated receptor- gamma inhibit keratinocyte proliferation." Arch Dermatol **136**(5): 609-16.

25 Farinelli, S. E., D. S. Park, et al. (1996). "Nitric oxide delays the death of trophic factor-deprived PC12 cells and sympathetic neurons by a cGMP-mediated mechanism." J Neurosci **16**(7): 2325-34.

Flohe, L. and F. Otting (1984). "Superoxide dismutase assays." Methods Enzymol **105**: 93-104.

Fruchart, J. C., B. Staels, et al. (2001). "PPARS, metabolic disease and atherosclerosis." Pharmacol Res **44**(5): 345-52.

Gervois, P., N. Vu-Dac, et al. (2001). "Negative regulation of human fibrinogen gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists via inhibition of CCAAT box/enhancer-binding protein beta." J Biol Chem 276(36): 33471-7.

5 Gilgun-Sherki, Y., E. Melamed, et al. (2001). "Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier." Neuropharmacology 40(8): 959-75.

10 Gorelick, P. B. (2002). "Stroke prevention therapy beyond antithrombotics: unifying mechanisms in ischemic stroke pathogenesis and implications for therapy: an invited review." Stroke 33(3): 862-75.

15 Greene, L. A. and A. S. Tischler (1976). "Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor." Proc Natl Acad Sci U S A 73(7): 2424-8.

20 Habig, W. H. and W. B. Jakoby (1981). "Assays for differentiation of glutathione S-transferases." Methods Enzymol 77: 398-405.

Jurgens, G., H. F. Hoff, et al. (1987). "Modification of human serum low density lipoprotein by oxidation-- characterization and pathophysiological implications." Chem Phys Lipids 45(2-4): 315-36.

25 Kainu, T., A. C. Wikstrom, et al. (1994). "Localization of the peroxisome proliferator-activated receptor in the brain." Neuroreport 5(18): 2481-5.

Komuves, L. G., K. Hanley, et al. (2000). "Stimulation of PPARalpha promotes epidermal keratinocyte differentiation in vivo." J Invest Dermatol 115(3): 353-60.

Lebeau, J., C. Furman, et al. (2000). "Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids." Free Radic Biol Med 29(9): 900-12.

25 Lutsep, H. L. and W. M. Clark (2001). "Current status of neuroprotective agents in the treatment of acute ischemic stroke." Curr Neurol Neurosci Rep 1(1): 13-8.

Mates, J. M., C. Perez-Gomez, et al. (1999). "Antioxidant enzymes and human diseases." Clin Biochem 32(8): 595-603.

30 Morliere, P., A. Moysan, et al. (1991). "UVA-induced lipid peroxidation in cultured human fibroblasts." Biochim Biophys Acta 1084(3): 261-8.

Nandagopal, K., T. M. Dawson, et al. (2001). "Critical role for nitric oxide signaling in cardiac and neuronal ischemic preconditioning and tolerance." J Pharmacol Exp Ther **297**(2): 474-8.

5 Paglia, D. E. and W. N. Valentine (1967). "Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase." J Lab Clin Med **70**(1): 158-69.

Raspe, E., L. Madsen, et al. (1999). "Modulation of rat liver apolipoprotein gene expression and serum lipid levels by tetradecylthioacetic acid (TTA) via PPARalpha activation." J Lipid Res **40**(11): 2099-110.

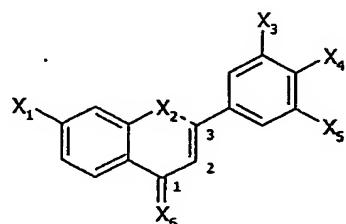
10 Rothwell, N. J. (1997). "Cytokines and acute neurodegeneration." Mol Psychiatry **2**(2): 120-1.

Smith, K. J., E. Dipreta, et al. (2001). "Peroxisomes in dermatology. Part II." J Cutan Med Surg **5**(4): 315-22.

15 Spooner, R. J., A. Delides, et al. (1981). "Heat stability and kinetic properties of human serum glutathione reductase activity in various disease states." Biochem Med **26**(2): 239-48.

## REVENDICATIONS

5 1- Dérivés de 1,3-diphénylprop-2-èn-1-one substitués, caractérisés en ce qu'ils présentent la formule (I) suivante :



(I)

dans laquelle :

10

X1 représente un halogène ou un groupement -R1 ou un groupement répondant à la formule suivante : -G1-R1,

15

X2 représente un atome d'hydrogène ou un groupement thionitroso ou un groupement hydroxy ou un groupement alkylcarbonyloxy ou un groupement alkyloxy ou un groupement thiol ou un groupement alkylthio ou un groupement alkylcarbonylthio, X2 peut également représenter un atome d'oxygène ou de soufre lié au carbone 3 de la chaîne propène, pour former un dérivé de type 2-phényl-4H-1-benzopyran-4-one,

20

X3 représente un groupement -R3 ou un groupement répondant à la formule suivante : -G3-R3,

25

X4 représente un halogène ou un groupement thionitroso ou un groupement -R4 ou un groupement répondant à la formule suivante : -G4-R4,

X5 représente un groupement -R5 ou un groupement répondant à la formule suivante : -G5-R5,

X6 est un atome d'oxygène ou un atome d'azote, dans le cas où X6 est un atome d'azote, il porte un atome d'hydrogène ou un groupement hydroxy ou un groupement alkyloxy.

5 R1, R3, R4, R5, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un groupement alkyle substitué ou non par un groupement faisant partie du groupe 1 ou du groupe 2 définis ci-dessous,

10 G1, G3, G4, G5, identiques ou différents, représentent un atome d' oxygène ou de soufre,

avec au moins un des groupements X1, X3, X4 ou X5 répondant à la formule -G-R, et

15 avec au moins un des groupements R1, R3, R4 ou R5 présent sous la forme d'un radical alkyle portant au moins un substituant du groupe 1 ou 2, ledit radical alkyle étant lié directement au cycle ou étant associé à un groupement G selon la formule -GR,

20 les substituants du groupe 1 sont choisis parmi les groupements carboxy de formule : -COOR<sub>6</sub> et les groupements carbamoyle de formule : -CONR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>,

les substituants du groupe 2 sont choisis parmi l'acide sulfonique (-SO<sub>3</sub>H) et les groupements sulfonamide de formule : -SO<sub>2</sub>NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>

25 avec R<sub>6</sub> et R<sub>7</sub>, identiques ou différents, représentant un atome d'hydrogène ou un radical alkyle éventuellement substitué par au moins un groupe de type 1 ou 2,

30 leurs isomères optiques et géométriques, leurs racémates, leurs tautomères, leurs sels, leurs hydrates et leurs mélanges,

à l'exclusion des composés de formule (I) dans laquelle

-  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  et  $X_5$  représentent simultanément un atome d'hydrogène,  $X_6$  représente un atome d'oxygène et  $X_4$  représente un groupement de formule  $-O-CR_8R_9-COOR_{10}$ , avec  $R_8$  et  $R_9$ , identiques ou différents, représentent un radical alkyle de C1-C2, et  $R_{10}$  représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle de C1-C7, et

5

-  $X_2$ ,  $X_3$  et  $X_5$  représentent simultanément un atome d'hydrogène,  $X_1$  représente un atome d'halogène ou un radical  $R_1$  ou  $-G_1R_1$ , où  $R_1$  représente un radical alkyle non substitué de C1-C2 et  $G_1$  représente un atome d'oxygène,  $X_6$  représente un atome d'oxygène et  $X_4$  représente un groupement de formule  $-O-CR_{11}R_{12}-COOR_{10}$ , avec  $R_{11}$  et  $R_{12}$ , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical alkyle de C1-C2, et  $R_{10}$  représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle de C1-C7.

10

2- Dérivés selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils peuvent correspondre à la conformation cis, trans ou leur mélange.

15

3- Dérivés selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils présentent une formule (I) dans laquelle au moins un  $X_1$ ,  $X_3$ ,  $X_4$  et  $X_5$  comprend une fonction acide ou ester.

20

4- Dérivés selon la revendication 1 ou 2, caractérisés en ce que  $X_4$  est un groupement thionitroso ou un groupement  $-R_4$  ou un groupement répondant à la formule  $-G_4-R_4$ , dans laquelle  $G_4$  et  $R_4$  sont tels que définis à la revendication 1.

25

5- Dérivés selon la revendication 1, caractérisés en ce que  $X_2$  est un groupement thionitroso ou un groupement hydroxy ou un groupement alkyloxy ou un groupement thiol ou un groupement alkylthio.

30

6- Dérivés selon la revendication 1, caractérisés en ce que  $X_4$  est un groupement thionitroso ou un groupement  $-R_4$  ou un groupement répondant à la formule  $-G_4-R_4$  et  $X_2$  est un groupement thionitroso ou un groupement hydroxy ou un groupement alkyloxy ou un groupement thiol ou un groupement alkylthio, dans laquelle  $G_4$  et  $R_4$  sont tels que définis à la revendication 1.

7- Dérivés selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisés en ce que  $X_1$  est un groupement  $-G_1-R_1$  et en ce que  $R_1$  est un groupement alkyle portant un substituant du groupe 1, avec  $G_1$  et le substituant du groupe 1 tels que définis à la revendication 1.

8- Dérivés selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisés en ce que  $X_4$  est un groupement  $-G_4-R_4$  et en ce que  $R_4$  est un groupement alkyle portant un substituant du groupe 1, avec  $G_4$  et le substituant du groupe 1 tels que définis à la revendication 1.

9- Dérivés selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisés en ce que  $X_4$  est un groupement  $-G_4-R_4$ ,  $R_4$  est tel que défini à la revendication 1 et  $X_3$  ou  $X_5$  représente respectivement  $R_3$  ou  $G_3R_3$ , d'une part, et  $R_5$  ou  $G_5R_5$ , d'autre part, avec  $R_3$  ou  $R_5$  est un groupement alkyle portant un substituant du groupe 1, ledit substituant du groupe 1 étant tel que défini à la revendication 1.

10- Dérivés selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisés en ce que  $X_1$  est un groupement  $-G_1-R_1$  dans lequel  $G_1$  est un atome d'oxygène et  $R_1$  est un groupement alkyle portant un substituant du groupe 1, ledit substituant du groupe 1 étant tel que défini à la revendication 1.

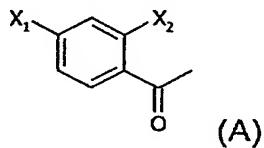
11- Dérivés selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisés en ce que  $X_4$  est un groupement  $-G_4-R_4$  dans lequel  $G_4$  est un atome d'oxygène et  $R_4$  est un groupement alkyle portant un substituant du groupe 1, ledit substituant du groupe 1 étant tel que défini à la revendication 1.

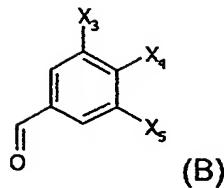
12- Dérivés selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisés en ce que  $X_4$  est un groupement  $-G_4-R_4$  dans lequel  $G_4$  est un atome d'oxygène,  $R_4$  est tel que défini à la revendication 1 et  $X_3$  ou  $X_5$  représente respectivement  $R_3$  ou  $G_3R_3$ , d'une part, et  $R_5$  ou  $G_5R_5$ , d'autre part, avec  $R_3$  ou  $R_5$  est un groupement alkyle portant un substituant du groupe 1, ledit substituant du groupe 1 étant tel que défini à la revendication 1.

13- Dérivé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi le 1-[2-hydroxy-4-chlorophényl]-3-[4-carboxydiméthylméthyloxyphényl]prop-2-èn-1-one, le 1-[2-hydroxy-4-chlorophényl]-3-[4-isopropylloxycarbonyl diméthylméthyloxyphényl]prop-2-èn-1-one, le 1-[2-hydroxyphényl]-3-[4-carboxydiméthylméthyloxyphényl]prop-2-èn-1-one, le 1-[2-hydroxyphényl]-3-[4-isopropylloxycarbonyldiméthylméthyloxyphényl]prop-2-èn-1-one, le 1-[2-méthylcarbonyloxyphényl]-3-[4-carboxydiméthylméthyloxyphényl]prop-2-èn-1-one, le 1-[2-méthylcarbonyloxyphényl]-3-[4-isopropyloxycarbonyldiméthylméthyloxyphényl]prop-2-èn-1-one, le 1-[2-hydroxyphényl]-3-[4-carboxydiméthylméthyloxyphényl]-1-hydroxyiminoprop-2-ène et le 1-[2-hydroxyphényl]-3-[4-isopropylloxycarbonyldiméthylméthyloxyphényl]-1-hydroxyiminoprop-2-ène, le 1-[2-hydroxy-4-carboxydiméthylméthyloxyphényl]-3-[3,5-ditertbutyl-4-hydroxyphényl]prop-2-èn-1-one, le 1-[2-hydroxy-4-éthoxy carbonyldiméthylméthyloxyphényl]-3-[3,5-ditertbutyl-4-hydroxyphényl]prop-2-èn-1-one, le 1-[2-hydroxyphényl]-3-[3-carboxydiméthylméthyloxy-4-hydroxy-5-tertbutyl phényl]prop-2-èn-1-one, le 1-[2-hydroxyphényl]-3-[3-isopropylloxycarbonyldiméthylméthyloxy-4-hydroxy-5-tertbutylphényl]prop-2-èn-1-one, le 1-[2-hydroxy-4-chlorophényl]-3-[3-carboxydiméthylméthyloxy-4-hydroxy-5-tertbutylphényl]prop-2-èn-1-one, le 1-[2-hydroxy-4-chlorophényl]-3-[3-isopropylloxycarbonyldiméthylméthyloxy-4-hydroxy-5-tertbutylphényl]prop-2-èn-1-one, le 1-[2-hydroxy-4-chlorophényl]-3-[3-carboxydiméthylméthyl-4-hydroxy-5-tertbutylphényl]prop-2-èn-1-one, le 1-[2-hydroxyphényl]-3-[3-isopropylloxycarbonyldiméthylméthyl-4-hydroxy-5-tertbutylphényl]prop-2-èn-1-one, le 1-[2-hydroxy-4-chlorophényl]-3-[3-carboxydiméthylméthyl-4-hydroxy-5-tertbutylphényl]prop-2-èn-1-one, le 1-[2-hydroxy-4-chlorophényl]-3-[3-isopropylloxycarbonyldiméthylméthyl-4-hydroxy-5-tertbutylphényl]prop-2-èn-1-one, le 1-[2-hydroxy-4-chlorophényl]-3-[3,5-diméthoxy-4-carboxydiméthylméthyloxy]prop-2-èn-1-one, le 1-[2-hydroxy-4-chlorophényl]-3-[3,5-diméthoxy-4-isopropylloxycarbonyldiméthylméthyloxy phényl]prop-2-èn-1-one, le 1-[2-hydroxyphényl]-3-[3,5-diméthoxy-4-carboxydiméthylméthyloxyphényl]prop-2-èn-1-one, le 1-[2-hydroxyphényl]-3-[3,5-diméthoxy-4-isopropylloxycarbonyl diméthylméthyloxyphényl]prop-2-èn-1-one, le 1-[2-hydroxy-4-carboxydiméthylméthyloxyphényl]-3-[3,5-di-méthoxy-4-hydroxyphényl]prop-2-èn-1-one, le 1-[2-

hydroxy-4-isopropoxycarbonyldiméthylméthoxyphényl]-3-[3,5-diméthoxy-4-hydroxyphényl]prop-2-èn-1-one, le 1-[2-hydroxy-4-chlorophényl]-3-[3,4-dihydroxy-5-carboxydiméthylméthoxyphényl]-2-prop-2-èn-1-one, le 1-[2-hydroxy-4-chlorophényl]-3-[3,4-dihydroxy-5-isopropoxycarbonyldiméthylméthoxyphényl]-2-propen-1-one, le 1-[2-hydroxy-4-carboxydiméthylméthoxyphényl]-3-[3,5-diméthyl-4-hydroxyphényl]prop-2-èn-1-one, le 1-[2-hydroxy-4-isopropoxycarbonyldiméthylméthoxyphényl]-3-[3,5-diméthyl-4-hydroxyphényl]prop-2-èn-1-one, le 1-[2-hydroxy-4-chlorophényl]-3-[3,5-diméthyl-4-carboxydiméthylméthoxyphényl]prop-2-èn-1-one, le 1-[2-hydroxy-4-chlorophényl]-3-[3,5-diméthyl-4-isopropoxycarbonyldiméthylméthoxyphényl]prop-2-èn-1-one, le 1-[2-hydroxy-4-carboxydiméthylméthoxyphényl]-3-[3,5-diméthyl-4-isopropoxycarbonyl diméthylméthoxyphényl]prop-2-èn-1-one, le 1-[2-hydroxyphényl]-3-[3-carboxydiméthylméthoxyphényl]prop-2-èn-1-one, le 1-[2-hydroxyphényl]-3-[3-isopropoxycarbonyldiméthylméthoxyphényl]prop-2-èn-1-one, le 1-[2-hydroxyphényl]-3-[4-carboxydiméthylméthylthiophényl]prop-2-èn-1-one, le 1-[2-hydroxyphényl]-3-[4-isopropoxycarbonyldiméthylméthylthiophényl]prop-2-èn-1-one, le 1-[2-mercaptop-4-méthoxyphényl]-3-[4-carboxydiméthylméthoxyphényl]prop-2-èn-1-one et le 1-[2-mercaptop-4-méthoxyphényl]-3-[4-isopropoxycarbonyldiméthylméthoxyphényl]prop-2-èn-1-one.

14- Procédé de préparation de composés de formule (I), caractérisé en ce qu'il comprend une mise en contact en milieu basique ou en milieu acide d'au moins un composé de formule (A) avec au moins un composé de formule (B), les formules (A) et (B) étant :





formules dans lesquelles X1, X2, X3, X4 et X5 ont les définitions données à la revendication 1.

5            15. Composition pharmaceutique comprenant, dans un support acceptable sur le plan pharmaceutique, au moins un composé de formule (I) tel que défini dans l'une des revendications 1 à 13.

10            16. Composition pharmaceutique selon la revendication précédente, pour le traitement ou la prophylaxie d'une pathologie vasculaire cérébrale.

              17. Composition pharmaceutique selon la revendication 16, caractérisée en ce que la pathologie vasculaire cérébrale est l'ischémie cérébrale.

15            18. Composition pharmaceutique selon la revendication 16, caractérisée en ce que la pathologie vasculaire cérébrale est un accident hémorragique cérébral.

              19. Utilisation d'au moins un dérivé de 1,3-diphénylprop-2-èn-1-one substitués pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à traiter de manière préventive ou de préférence curative une pathologie vasculaire cérébrale et plus particulièrement l'ischémie cérébrale, caractérisé en ce que le dérivé de 1,3-diphénylprop-2-èn-1-one substitué présente une formule générale (I) telle que définie dans l'une des revendications 1 à 13, y compris les composés de formule générale (I) dans laquelle :

20            - X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> et X<sub>5</sub> représentent simultanément un atome d'hydrogène, X<sub>6</sub> représente un atome d'oxygène et X<sub>4</sub> représente un groupement de formule -O-CR<sub>8</sub>R<sub>9</sub>-COOR<sub>10</sub>, avec R<sub>8</sub> et R<sub>9</sub>, identiques ou différents, représentent un radical alkyle de C1-C2, et R<sub>6</sub> représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle de C1-C7, et

25

-  $X_2$ ,  $X_3$  et  $X_5$  représentent simultanément un atome d'hydrogène,  $X_1$  représente un atome d'halogène ou un radical  $R_1$  ou  $-G_1R_1$ , où  $R_1$  représente un radical alkyle non substitué de C1-C2 et  $G_1$  représente un atome d'oxygène,  $X_6$  représente un atome d'oxygène et  $X_4$  représente un groupement de formule  $-O-CR_{11}R_{12}-COOR_{10}$ , avec  $R_{11}$  et  $R_{12}$ , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical alkyle de C1-C2, et  $R_{10}$  représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle de C1-C7.

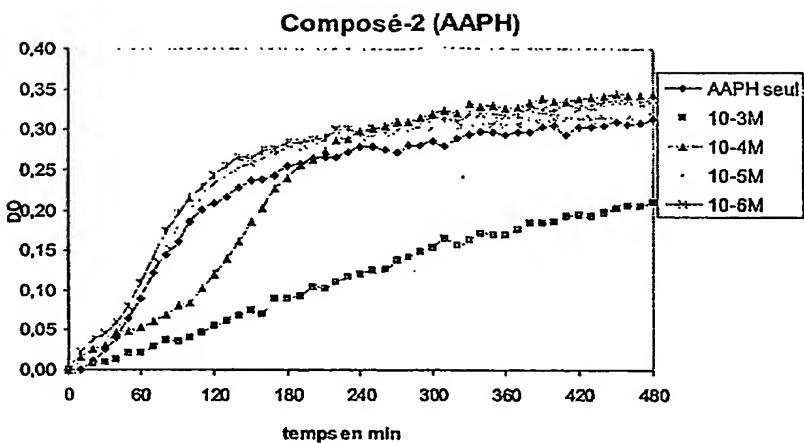


Figure 1-a

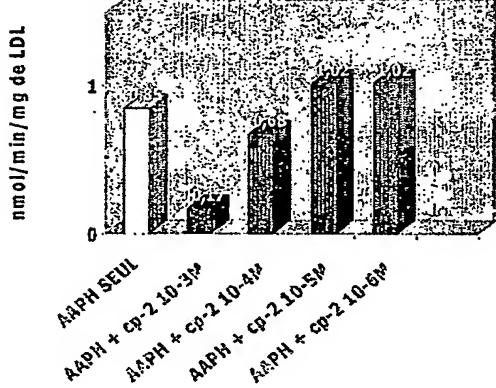


Figure 1-b

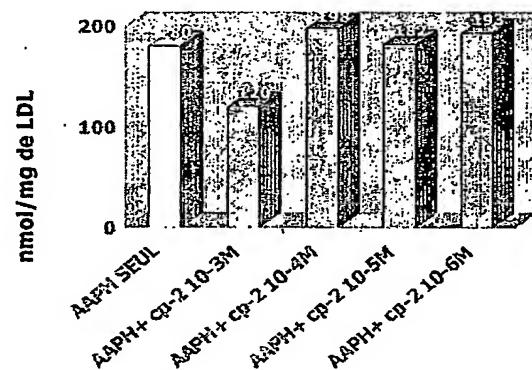


Figure 1-c

Figure 1

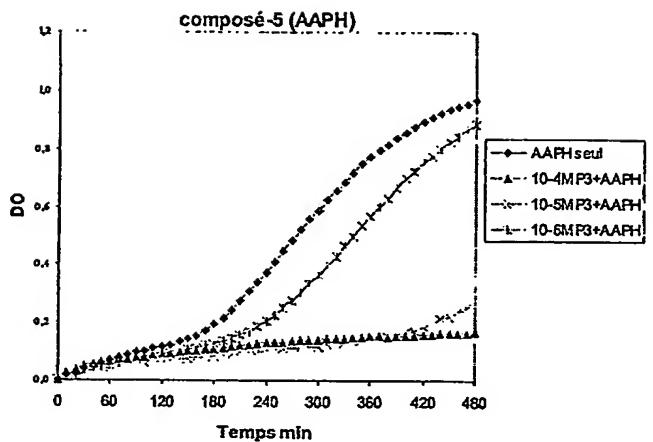


Figure 2-a

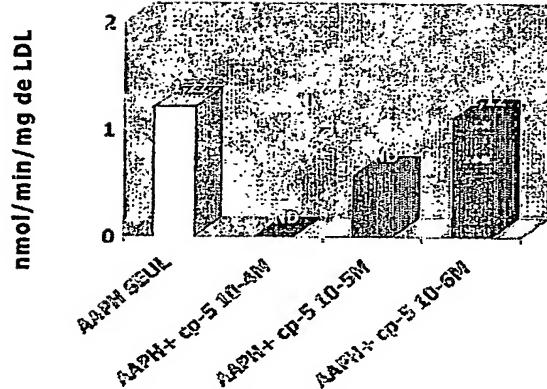


Figure 2-b

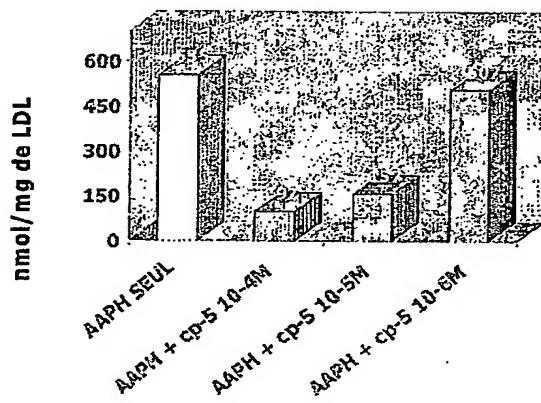


Figure 2-c

Figure 2

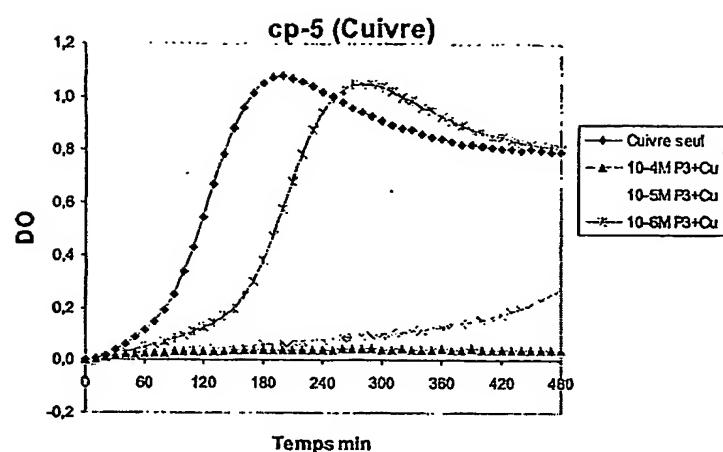


Figure 3-a

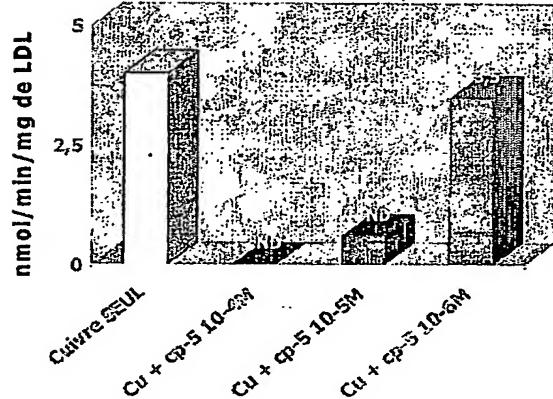


Figure 3-b

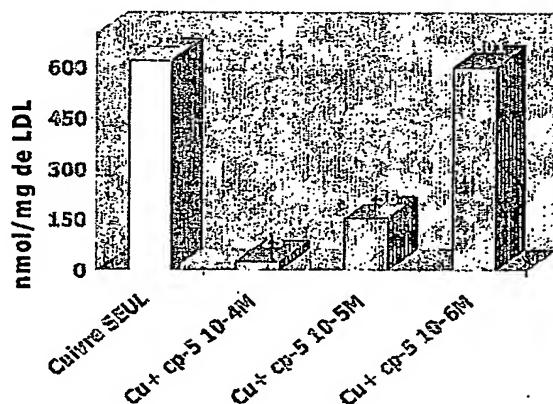


Figure 3-c

Figure 3

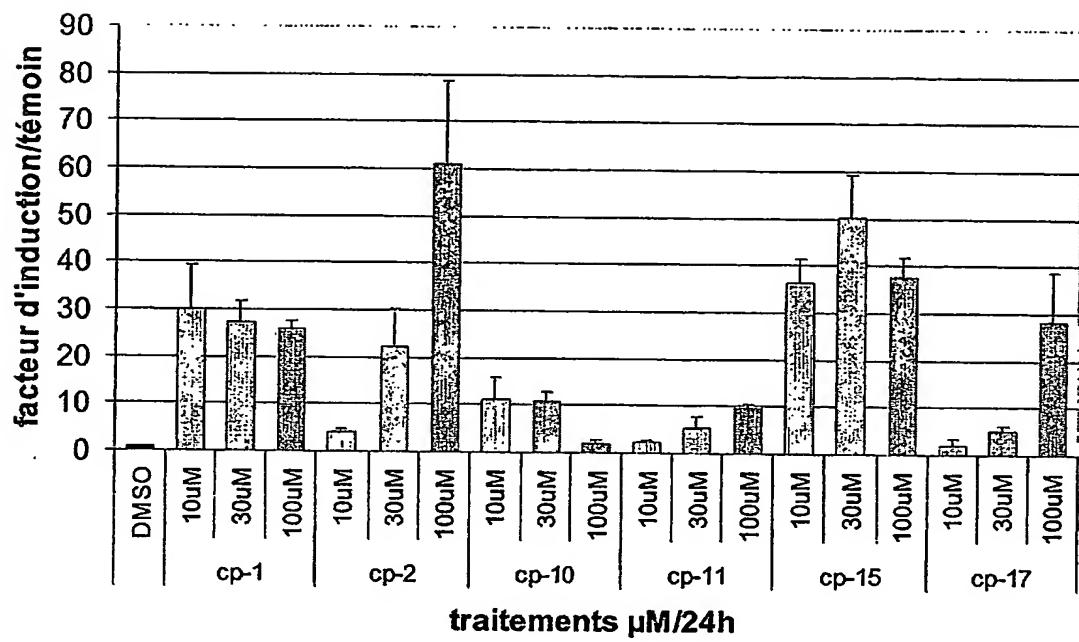


Figure 4

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

### DÉPARTEMENT DES BREVETS

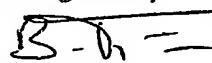
26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° J... / J...

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 W /260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		B0142FR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		02 08571	
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) Nouveaux dérivés de 1,3-diphénylprop-2-en-1-one substitués, préparation et utilisations			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b> GENFIT			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b> (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		NAJIB	
Prénoms		Jamilia	
Adresse	Rue	185, rue Clémenceau	
	Code postal et ville	59211	SANTES
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		CAUMONT-BERTRAND	
Prénoms		Karine	
Adresse	Rue	31, rue Olivier de Serres	
	Code postal et ville	59930	LA CHAPELLE D'ARMENTIERES
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b>			
<b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b>			
<b>OU DU MANDATAIRE</b>			
<b>(Nom et qualité du signataire)</b>			
Le 29 août 2002 			
TEZIER HERMAN Béatrice n° 00-10000			

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

**BLACK BORDERS**

**IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

**FADED TEXT OR DRAWING**

**BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

**SKEWED/SLANTED IMAGES**

**COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

**GRAY SCALE DOCUMENTS**

**LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

**REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

**OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**